

Aus dem Institut für Veterinär-Physiologie
der Universität Zürich
Direktor: Prof. Dr. E. Scharrer

UNTERSUCHUNGEN ZUR SÄTTIGUNGSWIRKUNG VON GLUCAGON

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Veterinär-Medizinischen Fakultät
der Universität Zürich

vorgelegt von
MARKUS DUSS
Tierarzt
von Escholz matt LU

genehmigt auf Antrag von
Prof. Dr. E. Scharrer, Referent
Prof. Dr. R. von Fellenberg, Korreferent

Zürich 1986

Maus Offsetdruck
Konstanz 1986

Aus dem Institut für Veterinär-Physiologie
der Universität Zürich

(Direktor: Prof. Dr. E. Scharrer)

**UNTERSUCHUNGEN ZUR SAETTIGUNGSWIRKUNG
VON GLUCAGON**

INAUGURAL - DISSERTATION
zur Erlangung der Doktorwürde
der Veterinär-Medizinischen Fakultät
der Universität Zürich

vorgelegt von

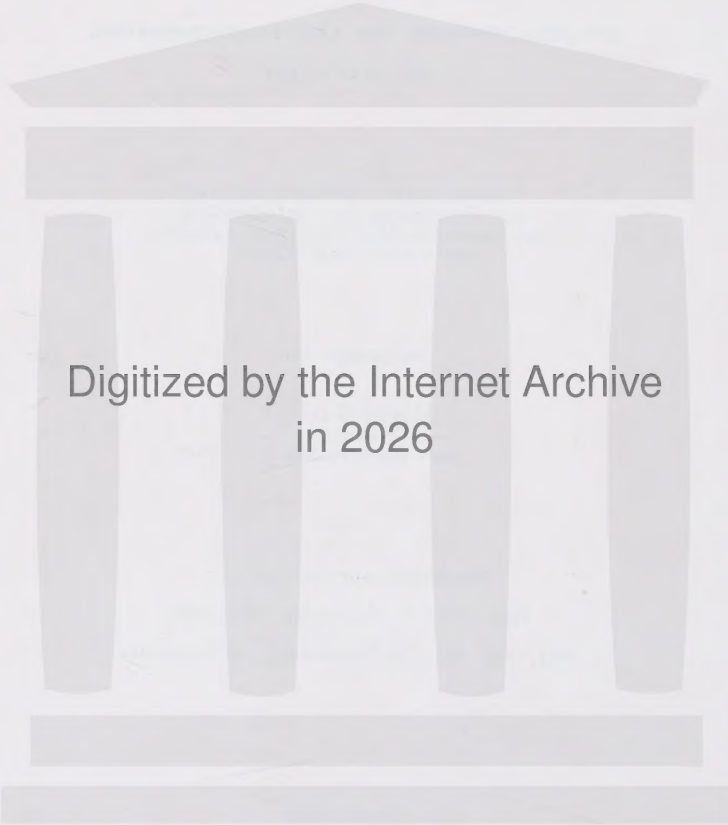
MARKUS DUSS
Tierarzt
von Escholz matt LU

genehmigt auf Antrag von

Prof. Dr. E. Scharrer, Referent

Prof. Dr. R. von Fellenberg, Korreferent

Zürich 1986



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41507227_0004

MEINEN ELTERN

INHALTSVERZEICHNIS

Kapitel I: Einleitung	1
Kapitel II: Literatur	2
Kapitel III: Material und Methoden	11
Versuchstiere und Haltungsbedingungen	11
Futteraufnahme	14
Injektionen	14
Blutentnahme	15
Blutglucose	15
Leberglycogen	16
Freie Fettsäuren	16
Glucagon	17
Statistik	18
Kapitel IV: Ergebnisse	19
Experiment I:	19
Experiment Ia:	20
Versuchsanordnung	20
Ergebnisse	22
Experiment Ib:	24
Versuchsanordnung	24
Ergebnisse	24
Experiment Ic:	27
Versuchsanordnung	27
Ergebnisse	27
Experiment II:	31
Experiment IIa:	31
Versuchsanordnung	31
Ergebnisse	32
Experiment IIb:	35
Versuchsanordnung	35
Ergebnisse	35
Experiment III:	40
Versuchsanordnung	40
Ergebnisse	42
Experiment IV:	44
Versuchsanordnung	44
Ergebnisse	45
Kapitel V: Diskussion	49
Kapitel VI: Zusammenfassung	56

Kapitel VII: Summary	58
Literaturverzeichnis	60
Lebenslauf	71

Kapitel I

EINLEITUNG

Die Nahrungsaufnahme erfolgt bei Mensch und Tier periodisch, d. h. in Form von Mahlzeiten und wird durch das komplexe Zusammenspiel vieler Faktoren reguliert. Die Nährstoffe und bei geringer energetischer Dichte auch das Volumen der aufgenommenen Nahrung lösen im Magen und Dünndarm präabsorptive Sättigungssignale aus, die auf humoralem oder nervalem Weg[72] das Gehirn erreichen. Neben diesen präabsorptiven Sättigungssignalen gibt es auch postabsorptive, metabolische Sättigungssignale. Dabei kommen resorbierte im Blut zirkulierende Nährstoffe oder deren Metabolite als humorale Sättigungssignale in Betracht, die möglicherweise über eine Stimulierung von Chemorezeptoren in der Leber an der Sättigung beteiligt sind[72]. Ferner scheint es auch von den Fettdepots ausgehende Sättigungssignale zu geben[72]. Die Sättigungssignale aus der Peripherie werden im Gehirn integriert und in Hunger (= Nahrungsaufnahmetrieb) und Sättigung (= Stillung des Nahrungsaufnahmetriebes) bzw. in die entsprechenden Verhaltensweisen "übersetzt". Dabei gibt es offenbar keine qualitativ unterschiedlichen Hunger- oder Sättigungssignale, sondern Hunger bzw. Sättigung scheinen durch Veränderungen der Intensität derselben Signale determiniert zu werden. Im Zusammenhang mit postabsorptiven Sättigungssignalen ist auch die Wirkung des pankreatischen Inselzellhormons Glucagon auf den Verzehr interessant. Es ist bekannt, dass Glucagon nach parenteraler Applikation, wahrscheinlich über eine Wirkung auf den hepatischen Stoffwechsel, Sättigung induziert. In der vorliegenden Arbeit wurde diese Sättigungswirkung von Glucagon weiter untersucht.

Kapitel II

LITERATUR

Pankreatisches Glucagon ist ein einkettiges Peptidhormon, das aus 29 Aminosäuren besteht, deren Sequenz bekannt ist. Das Molekulargewicht von Glucagon beträgt 3485. Mit Ausnahme des Meerschweinchens wurde bei allen bis heute untersuchten Säugetieren die gleiche Primärstruktur von Glucagon gefunden.

Glucagon wird von den Alpha-Zellen des endokrinen Pankreas produziert und sezerniert. Neben dem "echten" pankreatischen Glucagon gibt es im Plasma noch eine Reihe von glucagonähnlichen Polypeptiden. Diese stammen von Pankreas, Darm und Magen und reagieren mit Antisera gegen pankreatisches Glucagon[82]. Ungeachtet ihrer Herkunft teilt man diese Peptide aufgrund ihrer Fähigkeit, mit spezifischen Antikörpern zu reagieren, in zwei grosse Gruppen ein[82]. Polypeptide, die hauptsächlich mit Antikörpern reagieren, die spezifisch gegen die Aminosäuresequenz am COOH-Ende des "echten" Glucagons gerichtet sind, werden als "immunoreactive glucagon" (IRG) bezeichnet. Die Gruppe der "glucagon-like immunoreactants" (GLI) reagiert im Gegensatz dazu hauptsächlich mit Antikörpern, die spezifisch gegen die NH₂-terminale Aminosäuresequenz des "echten" Glucagons gerichtet sind. Eine weitere Differenzierung innerhalb der Gruppen IRG und GLI ist anhand des Molekulargewichts möglich. Mit der Gelfiltration sind vier verschiedene IRG-Fractionen voneinander trennbar.

Die Fraktion I erscheint zusammen mit den Globulinen und wird als "big plasma glucagon" (BPG) bezeichnet. Das Molekulargewicht des BPG beträgt ungefähr 150'000. Ursprung und Charakter des BPG sind bis jetzt noch unklar. Es soll sich dabei entweder um ein an

Immunglobuline gebundenes "echtes" Glucagon (MG 3485) handeln und/oder um ein grosses, unspezifisches Plasmaprotein, das Kreuzreaktionen mit bestimmten Glucagonantikörpern eingeht[32,74].

Die Fraktion II (IRG⁹⁰⁰⁰) hat ein Molekulargewicht von 9'000-12'000. Diese Polypeptide scheinen ebenfalls von den Alpha-Zellen sezerniert zu werden[82] und sind vermutlich Zwischenprodukte der Glucagonsynthese. Diese Fraktion des IRG wird daher auch als Proglucagon bezeichnet[61].

Die Fraktion III (IRG³⁵⁰⁰) repräsentiert das "echte" pankreatische Glucagon (MG 3485).

Bei der Fraktion IV (IRG²⁰⁰⁰) mit einem Molekulargewicht unter 2000 handelt es sich vermutlich um ein Abbauprodukt des "echten" Glucagons, das noch eine gewisse Immunoreaktivität behalten hat[32].

Die Differenzierung der GLI-Peptide ergibt ebenfalls mehrere Fraktionen, deren Molekulargewichte im gleichen Bereich liegen wie die der IRG-Fraktionen[82]. Die einzelnen GLI-Fraktionen sind aber bisher kaum charakterisiert.

Im folgenden soll nur noch vom "echten" pankreatischen Glucagon die Rede sein. Dieses wird physiologischerweise vor allem bei Energiemangelzuständen zur Erhaltung der Normoglycämie, aber auch in Stresssituationen zur prompten Energiebereitstellung für Muskeln und Gehirn sezerniert.

Glucagon wirkt über einen "second-messenger-Mechanismus". Es wird dabei an spezifische Rezeptoren der Zellmembran gebunden und aktiviert das "Nukleotid-regulierende-Protein". Letzteres aktiviert die Adenyl-Zyklase durch Anlagerung von Guanosintriphosphat. Die aktivierte Adenyl-Zyklase bewirkt die Bildung von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP, 3'5'AMP) aus ATP. cAMP aktiviert über verschiedene Zwischenschritte bestimmte Enzyme der durch Glucagon beeinflussten Stoffwechselvorgänge[67].

Glucagon hat vor allem katabole Effekte. Sein Hauptwirkort ist die Leber. Dort stimuliert es die Glycogenolyse[76] und Gluconeogenese[8] und erhöht damit den Glucoseausstrom aus der Leber[7]. Glucagon aktiviert in der Leber auch die β -Oxidation von Fettsäuren und die Ketogenese[14,51]. Weiter erhöht es die Aminosäureaufnahme in die Leberzelle sowie die Harnstoffsynthese[2]. Ferner führt es zu einer gesteigerten K^+ -Permeabilität der Leberzellmembran und zu einer Stimulation der Na^+/K^+ -ATPase[33] und damit zu einer Hyperpolarisation der Leberzellmembran[15]. Darüberhinaus aktiviert Glucagon die Lipolyse im Fettgewebe[42]. Vieles spricht dafür, dass Glucagon im Zusammenhang mit den erwähnten metabolischen Effekten ein hepatisches Sättigungssignal auslöst[18,34,36].

Insbesondere wegen seiner Wirkung auf den Kohlenhydrat(KH)-Stoffwechsel wurde Glucagon im Zusammenhang mit der glucostatischen Theorie der Verzehrsregulation von Mayer[47] schon relativ frühzeitig bei Untersuchungen über den Einfluss des KH-Stoffwechsels auf die Nahrungsaufnahme eingesetzt. Mayer postulierte, dass Fluktuationen in der Glucoseutilisationsrate von in Kerngebieten des ventromedialen Hypothalamus oder in der Peripherie gelegenen Glucoserezeptoren Hunger oder Sättigung auslösen. Sättigung sollte demnach durch eine hohe, Hunger dagegen durch eine niedrige Glucoseutilisationsrate bewirkt werden[47,49,50]. Diese Theorie setzt kurzfristige, relativ starke Schwankungen der KH-Reserven des Organismus voraus. Tatsächlich steigt die Blutglucosekonzentration, bzw. -utilisation im Verlaufe einer Mahlzeit an[77]. Bei den ersten Versuchen mit Glucagon in diesem Zusammenhang fand man, dass die parenterale Applikation von Glucagon die Hungerkontraktionen des Magens hemmt[48,78,79] und die Hungergefühle beim Menschen dämpft[65,78]. Dieser Effekt wurde mit der Steigerung der Glucoseutilisation nach Glucagonapplikation in Zusammenhang gebracht[78].

Ferner führte sowohl die akute[18,20,34], als auch die chronische[65] Applikation von Glucagon zu einer Verzehrsdepression. Bei chronischer Anwendung kam es zusätzlich zu einer Abnahme des Körpergewichts[65]. In weiteren Experimenten an Ratten, Kaninchen und Schafen wurde bestätigt, dass pankreatisches Glucagon die Futteraufnahme kurzfristig reduziert [10,45,83]. Infolge dieser Befunde vermuteten Martin und Novin[45], dass Glucagon ein Sättigungshormon ist. Tatsächlich zeigte es sich, dass Glucagon wichtige Anforderungen erfüllt, die an ein spezifisches Sättigungshormon gestellt werden[20]. So reduzierte die Applikation von Glucagon bei Ratten den Verzehr, insbesondere die Mahlzeitengröße, ohne das für Sättigung typische Verhaltensmuster zu beeinflussen[1]. Glucagon reduzierte dabei die Mahlzeitengröße durch eine Hemmung der Futteraufnahme am Ende der Mahlzeit, beeinflusste die Fressrate am Beginn der Mahlzeit jedoch nicht[20]. Es wurde weiter gezeigt, dass Glucagon einen spezifischen Sättigungseffekt hat. Glucagon hemmte nämlich die Aufnahme einer flüssigen Diät bei hungrigen Ratten, beeinflusste aber die Wasseraufnahme bei durstigen Ratten nicht[20,45]. Ein spezifisches Sättigungshormon sollte ferner den Verzehr nicht durch toxische Nebeneffekte hemmen. Auch dies scheint für Glucagon zuzutreffen. Intraperitoneale Glucagoninjektionen die den Verzehr bei Ratten reduzierten, führten nämlich zu keiner erlernten Geschmacksaversion[20]. Das Wohlbefinden der Tiere wurde durch Glucagon also offenbar nicht beeinträchtigt. Die Hemmung des Verzehrs nach Glucagoninjektionen beim Menschen erfolgte ebenfalls ohne Anzeichen von Unbehagen, Uebelkeit oder Schmerz[63,64,65]. Alle diese Befunde bestätigen die Annahme, dass exogenes Glucagon tatsächlich einen Sättigungseffekt hat und nicht den Verzehr durch Auslösen von Uebelkeit reduziert.

Dennoch wurde ein wichtiger Punkt in diesem Zusammenhang bisher überhaupt nicht berücksichtigt. Die bei Ratten verwendeten Glucagon-dosen waren im allgemeinen relativ hoch (25-800 µg/kg Körpergewicht).

Die Plasmaglucaconkonzentrationen nach der Applikation von Glucacon-dosen, die den Verzehr reduzierten, wurden jedoch nicht gemessen. Trotz der vielen Hinweise auf einen Sättigungseffekt von Glucacon bleibt deshalb die Frage offen, ob die Depression der Futteraufnahme nach der Injektion von Glucacon tatsächlich einen physiologischen Sättigungseffekt widerspiegelt.

Wie bereits erwähnt, wurde Glucacon ursprünglich auf der Basis von Mayer's Glucostatischer Theorie zu Untersuchungen über einen möglichen Zusammenhang zwischen KH-Stoffwechsel und Regulation der Nahrungsaufnahme herangezogen. Dementsprechend führte man den Sättigungseffekt von Glucacon von Anfang an vor allem auf dessen ausgeprägte hyperglycämische Wirkung zurück[18,34,45,84]. Tatsächlich liessen mehrere Befunde diesen Zusammenhang vermuten. Glucaconinjektionen reduzierten beispielsweise den Verzehr bei Kaninchen nicht mehr, wenn das Leberglycogen durch einen vorangegangenen, längeren Futterentzug verringert war[83,84]. Bei Ratten führten Glucaconinjektionen, die den Verzehr reduzierten, zu einer Glycogenolyse und zu einem Blutglucoseanstieg in der Vena hepatica, beeinflussten die Plasmakonzentrationen von freien Fettsäuren und D-3-Hydroxybutyrat aber nicht[18]. Ein kausaler Zusammenhang zwischen dem hyperglycämischen und dem verzehrsreduzierenden Effekt von Glucacon konnte jedoch nicht gezeigt werden.

Es ergaben sich im Gegenteil mehrfach Dissoziationen zwischen dem hyperglycämischen und dem verzehrsreduzierenden Effekt von Glucacon. Bereits 1964 fanden Penick und Smith[65], dass der Sättigungseffekt von Glucacon beim Menschen nicht gleichzeitig mit der durch Glucacon ausgelösten Hyperglycämie auftritt. Kürzlich wurde in Abhängigkeit von der Futterentzugsdauer sogar eine inverse Korrelation zwischen dem verzehrsreduzierenden und dem hyperglycämischen Effekt von Glucacon gezeigt[17]. Ferner verkleinerte intraperitoneal injiziertes Glucacon die Mahlzeiten bei scheingefütterten Ratten mit

offenen Magen fisteln nicht, obwohl die Blutglucosespiegel in der Vena hepatica nach der Glucagoninjektion sogar höher waren als in vergleichbaren Experimenten, in denen Glucagon die Mahlzeitengröße bei normal gefütterten Ratten verringerte[21]. Auch bei fettreich gefütterten Ratten trat nach intraperitonealer Glucagoninjektion trotz deutlicher Glycogenolyse und Hyperglycämie keine Verzehrsdepression auf[38]. Wie Glucagon Sättigung induziert, ist demnach immer noch unklar.

Damit eng verknüpft ist auch die Frage, wo im Organismus Glucagon Sättigung induziert. In neuerer Zeit konnten Gastrointestinalhormone, unter andern auch Glucagon und glucagonähnliche Peptide im Gehirn von Säugetieren nachgewiesen werden[80]. Sie scheinen dort als Neurotransmitter und/oder Neuromodulatoren zu wirken[29,80]. Auch Glucagonrezeptoren konnten im ZNS nachgewiesen werden[55]. Des weiteren wurde kürzlich gezeigt, dass die intracerebroventrikuläre Applikation von Glucagon bei Ratten zu einer kurzfristigen Verzehrsdepression führt[28].

Trotz dieser Hinweise auf eine zentrale Wirkung scheint Glucagon den Verzehr jedoch primär über einen hepatischen Mechanismus zu beeinflussen. Dafür sprechen Befunde, denen zufolge der Sättigungseffekt von Glucagon bei Ratten durch selektive Durchtrennung des hepatischen Vagusastes aufgehoben wird[22,44]. Der Sättigungseffekt von Glucagon wurde jedoch nicht beeinflusst, wenn bei gleichzeitiger Schonung des hepatischen Vagusastes alle übrigen abdominalen Vagusäste durchtrennt wurden[22], oder wenn die efferenten Vagusfasern mittels der Injektion von Atropinmethylnitrat blockiert wurden[22]. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass intakte afferente Fasern des hepatischen Vagusastes für den verzehrsreduzierenden Effekt von Glucagon notwendig sind. Die Resultate bestätigen und erweitern frühere Arbeiten, in denen eine vollständige subdiaphragmatische Vagotomie den verzehrsreduzierenden Effekt von Glucagon bei

Ratten[46] und bei Kaninchen[83] aufhob. Nach Befunden von Bel-linger und Williams[6] blieb der Sättigungseffekt von Glucagon jedoch nach vollständiger Denervierung der Leber erhalten. Bisher gibt es keine plausible Erklärung für diesen Widerspruch.

Unabhängig von den Fragen wie und wo exogenes Glucagon die Fut-teraufnahme hemmt, sprechen neuere Ergebnisse dafür, dass endogenes Glucagon tatsächlich am Zustandekommen der Sättigung beteiligt ist. Es wurde nämlich gezeigt, dass die Plasmakonzentration von pankreati-schem Glucagon bei Ratten[11,37], Hunden[30,31] und beim Men-schen[81] im Verlauf einer Mahlzeit ansteigt. Nach DeJong et al.[11] war dieser Anstieg schon während der ersten Minute nach dem Mahlzei-tenbeginn zu beobachten, was auf eine reflexbedingte Glucagonfreiset-zung hindeutet. Dafür spricht auch, dass die elektrische Stimulierung des ventromedialen[11] oder des ventrolateralen[25] Hypothalamus zu einer Hyperglucagonämie führte. Ausserdem wurden katecholaminerge, cholinerge und peptiderge efferente Nervenfasern nachgewiesen, die an den pankreatischen Inselzellen enden und die Sekretion der Alpha-Zellen beeinflussen könnten[53].

Neben diesem nervalen Einfluss auf die Glucagonsekretion dürften verschiedene Gastrointestinalhormone, die vom Darm bei der Nahrungs-passage ins Blut sezerniert werden, zum Anstieg des Plasmagluca-gonspiegels während einer Mahlzeit beitragen. So ist bekannt, dass Gastrin, gastric inhibitory polypeptide, Substanz P, Neurotensin, Bom-besin, Cholecystokinin und vasoactive intestinal polypeptide die Gluca-gonsekretion stimulieren[62]. Viele dieser Gastrointestinalhormone konnten auch in den oben erwähnten peptidergen Nervenfasern der Langerhans'schen Inseln nachgewiesen werden, was auf eine duale Rol-le dieser Hormone im Rahmen der sogenannten enteroinsularen Achse hindeutet[53].

Im Hinblick auf eine möglicherweise zentrale Rolle der Leber für den Sättigungseffekt von Glucagon ist interessant, dass eine beträchtliche Menge des während einer Mahlzeit sezernierten Glucagons in der Leber verbleibt. So steigt während einer Mahlzeit der Plasmaglucagonspiegel vor allem in der Pfortader an[12,31,37]. Dieses in der Leber verbleibende Glucagon scheint glycogenolytisch bzw. hyperglycämisch zu wirken[37] und ist offenbar am Zustandekommen der Sättigung beteiligt. Die intraperitoneale Injektion von spezifischen gegen pankreatisches Glucagon gerichteten Antikörpern zu Beginn einer Mahlzeit bewirkte nämlich eine deutliche Zunahme von Grösse und Dauer dieser Mahlzeit[40]. Im Gegensatz dazu fanden McLaughlin et al.[52], dass die aktive Immunisierung von Ratten gegen pankreatisches Glucagon die mittlere tägliche Futteraufnahme geringfügig erniedrigte. In durch Herzpunktion gewonnenem Blut wurde dabei eine deutliche Abnahme des freien (nicht AK-gebundenen) pankreatischen Glucagons und eine starke Zunahme des gesamten (AK-gebundenen und freien) Glucagons festgestellt.

Trotzdem schliesst dieses Experiment einen physiologischen Sättigungseffekt von endogenem Glucagon nicht aus, weil die Mahlzeitengrösse und der Plasmaglucagonspiegel in der Pfortader während einer Mahlzeit nicht gemessen wurden. Es ist beispielsweise denkbar, dass selbst ein relativ hoher Antikörpertiter im zirkulierenden Blut von aktiv immunisierten Ratten nicht ausreicht, um während einer Mahlzeit vermehrt sezerniertes Glucagon in der kurzen Zeit von der Sekretion aus dem Pankreas bis zur Rezeptorbindung in der Leber zu binden. Möglicherweise wird deshalb wegen der bei aktiv immunisierten Ratten erhöhten Glucagonsekretion sogar mehr Glucagon in der Leber wirksam als bei nicht immunisierten Ratten.

Nach Abwägung aller Argumente spricht vieles dafür, dass Glucagon einen Sättigungsfaktor darstellt. Wie dargelegt bleiben jedoch folgende Fragen offen:

1. Wie bewirkt Glucagon Sättigung?
2. Liegen die Plasmaglucagonspiegel nach Glucagoninjektionen, welche die Nahrungsaufnahme reduzieren, noch in einem physiologisch relevanten Bereich?

In der vorliegenden Arbeit wurden diese Fragen untersucht. Dazu wurde zunächst nach unterschiedlichen Manipulationen des Kohlenhydrat- und Fettstoffwechsels der Einfluss von intraperitonealen Glucagoninjektionen auf den Verzehr bei Ratten untersucht. Ferner wurden die Plasmaglucagonkonzentrationen in Vena portae, Vena hepatica und Aorta nach intraperitonealer Injektion unterschiedlich hoher Glucagondosen gemessen.

Kapitel III

MATERIAL UND METHODEN

3.1 Versuchstiere und Haltungsbedingungen

Für alle Versuche wurden männliche Sprague-Dawley-Ratten¹ verwendet. Ihr Körpergewicht betrug zum Zeitpunkt der Aufstallung 180-200 Gramm. Das Gewicht zum Zeitpunkt der Versuche ist bei den einzelnen Versuchen angegeben. Die Tiere wurden in einem fensterlosen Raum einzeln in Drahtkäfigen gehalten. Der Raum war von 23:00-11:00 Uhr beleuchtet. Die Raumtemperatur betrug $24 \pm 1^\circ\text{C}$. Die Ratten erhielten, wenn nicht anders erwähnt, Wasser und Futter ad libitum. Als Futter diente entweder eine pulverförmige Hochkohlenhydrat (HK) Diät oder eine pastöse Hochfett (HF) Diät. Die Diäten waren isokalorisch (16.5 kJ/g). Das Futter wurde in einem Pflugscharmischer² gemischt. Die Futterzusammensetzung ist in den Tabellen 1-3 aufgeführt.

Vor Beginn der Experimente wurden die Ratten mindestens 14 Tage lang an die Haltungsbedingungen und an die Manipulationen (Herausnehmen, Wiegen, Injektionen) gewöhnt, um Stresssituationen während der Experimente zu vermeiden.

¹ IwV, Gelting, BRD oder KFM, Füllinsdorf

² FM 50, Lödige, Paderborn, BRD

Tab. 1: Zusammensetzung der Diäten

	HK	HF
	%	%
Kasein ¹	12.87	12.87
Maisstärke ²	76.67	-
Sojaöl ³	3.33	3.54
Rindertalg ⁴	-	23.54
Schweineschmalz ⁵	-	12.92
Vitaminmischung ⁶	3.00	3.00
Mineralstoffmischung ⁷	4.00	4.00
Methionin ⁸	0.13	0.13
Hostalenpulver ⁹	-	40.00
Total	100.00	100.00

ad 1) Säurekasein (UFAG, Sursee)

ad 2) Stärke (Blattmann, Wädenswil)

ad 3) Sais (Horn)

ad 4), 5) Häute- und Fettwerk AG, Zürich

ad 6), 7) Kliba (Kaiseraugst)

ad 8) dl-Methionin (UFA-med, Sursee)

ad 9) Lupolen[®] (BASF, Ludwigshafen, BRD)

Tab. 2: Zusammensetzung der Mineralstoffmischung
(Gehalt in 100 g)

Ca	16.21	g
P	8.08	g
Na	6.63	g
K	9.01	g
Mg	3.90	g
Cl	10.20	g
Mn	66.46	mg
Fe	292.25	mg
Cu	17.35	mg
Zn	41.06	mg
J	2.68	mg
F	6.31	mg
Co	1.27	mg
Se	0.90	mg

Tab. 3: Zusammensetzung der Vitaminmischung
(Gehalt in 100 g)

Vitamin A	70'000	IE
Vitamin D ₃	7'000	IE
Vitamin E	491	mg
Vitamin C	180	mg
Vitamin B ₁	100	mg
Vitamin B ₂	60	mg
Vitamin B ₆	45	mg
Vitamin B ₁₂	120	µg
Nicotinsäure	180	mg
Pantothensäure	150	mg
Folsäure	10	mg
Biotin	3	mg
Cholin	1880	mg

3.2 Futteraufnahme

Die Menge des aufgenommenen Futters wurde durch Wiegen der Futternapfe auf 0.1 Gramm genau gemessen. Eventuell verstreutes Futter wurde durch untergelegtes Papier aufgefangen und mitgewogen. In Experiment IIa wurden Grösse und Dauer der ersten Mahlzeit nach einem 12-stündigen Futterentzug bestimmt. Dazu wurde das Verhalten jeder Ratte während des ganzen Versuchs alle zwei Minuten registriert. Der erste Bissen galt jeweils als Beginn der Mahlzeit. Das Ende der Mahlzeit wurde nach der für den Sättigungszustand typischen Verhaltenssequenz[1] bestimmt: Putzen, Lokomotion und schliesslich Hinlegen. Wurde eine Mahlzeit ohne das erwähnte Verhaltensmuster abgebrochen oder für mehr als sechs Minuten unterbrochen und danach wieder fortgesetzt, wurde sie für die Auswertung nicht berücksichtigt.

3.3 Injektionen

Alle Injektionen wurden mit sterilen Spritzen³ vorgenommen. Intrapitoneal wurde im Bereich der Linea alba, etwa in der Mitte zwischen Sternum und Präputium, injiziert. Die subkutanen Injektionen erfolgten in der Nackengegend.

Zur Herstellung der zu injizierenden Glucagonlösungen wurde Glucagon-HCl⁴ verwendet. Das lyophilisierte Glucagon wurde im mitgelieferten Lösungsmittel gelöst. Die im Kühlschrank (+4°C) aufbewahrte Stammlösung wurde jeweils kurz vor den Experimenten mit physiologischer Kochsalzlösung bis zur gewünschten Konzentration verdünnt. Die Konzentration der Glucagonlösung wurde dabei immer so gewählt, dass das Injektionsvolumen bei der höchsten Glucagondosis des jeweiligen Versuchs 1 ml betrug. Als Kontrolllösung diente physiologische Kochsalzlösung, die mit der gleichen Menge Lösungsmittel wie die Glucagonlösung versetzt war. Hier betrug das Injektionsvolumen entsprechend

³ Luer, 1 ml

⁴ Eli Lilly GmbH, Giessen, BRD

dem grössten Volumen der Glucagonlösung ebenfalls 1 ml. Für weitere Injektionen wurden wässrige Lösungen von Glucose, Na-Pyruvat, Na-Mercaptoacetat oder Ouabain verwendet. Die genaue Zusammensetzung der betreffenden Lösungen wird bei den einzelnen Experimenten beschrieben.

3.4 Blutentnahme

Zur Blutentnahme wurden heparinisierte⁵ Spritzen⁶ und Kanülen⁷ verwendet. Die Ratten wurden mit Aether narkotisiert und anschliessend laparotomiert. Danach wurden aus der Vena hepatica und der Vena portae jeweils ca. 0.5-0.8 ml Blut entnommen und sofort für die geplanten Metabolitenbestimmungen weiterverarbeitet. Bei jeder Ratte war die Blutentnahme spätestens drei Minuten nach Narkosebeginn beendet. Die Zeitpunkte der Blutentnahmen sind bei den einzelnen Experimenten angegeben.

3.5 Blutglucose

Zur Bestimmung der Blutglucosekonzentration wurde jeweils sofort nach der Blutentnahme zum Enteiweissen 0.1 ml Vollblut mit 1.0 ml Uranylacetatlösung⁸ versetzt und 10 Minuten bei 4000 U/min zentrifugiert. Die Glucosebestimmung im Ueberstand erfolgte dann nach der sogenannten Glucose-Peroxidase-Methode⁹.

Die in der Probe enthaltene Glucose wird bei diesem Test durch die Glucoseoxidase (GOD) zu Gluconsäure und Wasserstoffperoxid oxidiert. Aus dem Wasserstoffperoxid wird mittels einer Peroxidase (POD) Sauerstoff abgespalten, der einen reduzierten Farbstoff (Perid) oxidiert. Die

⁵ Liquemin[®], Roche, Basel

⁶ Luer, 1 ml

⁷ Terumo[®], 0.55 x 25 mm

⁸ Urac[®], Boehringer, Mannheim, BRD

⁹ Test Combination Glucose, GOD-Perid[®]-Methode,
Boehringer-Mannheim GmbH, Mannheim, BRD

im Photometer bei 436 nm gemessene Extinktion ist zur Glucosekonzentration der Probe proportional.

3.6 Leberglycogen

Unmittelbar nach der oben beschriebenen Blutentnahme wurde den Ratten zwecks Glycogenbestimmung der linke Leberlappen entnommen und sofort mit Hilfe einer in flüssigem Stickstoff gekühlten Zange tiefgefroren. Bis zur Aufarbeitung wurden die Leberstücke bei -20°C gelagert.

Das Verfahren zur Glycogenbestimmung wurde an anderer Stelle genau beschrieben[18,34]. Das Prinzip beruht auf der hydrolytischen Spaltung der Glucosidbindungen des Glycogens. Die Glucosekonzentration des Hydrolysats wurde nach der oben beschriebenen GOD-POD-Methode gemessen. Dabei wurde das bei der Hydrolyse aufgenommene Wasser (1 mol Wasser/1 mol Glucose) berücksichtigt. Alle Resultate sind in mg/g Leberfrischgewicht angegeben.

3.7 Freie Fettsäuren

Zur Bestimmung der freien Fettsäuren (FFS) im Plasma wurde ein enzymatischer Test¹⁰ verwendet. Die FFS werden dabei durch Acyl-CoA-Synthetase (ACS) in Anwesenheit von ATP und CoA in Acyl-CoA umgewandelt. Bei dieser Reaktion entstehen zusätzlich AMP und Pyrophosphat. Bei der Oxidation von Acyl-CoA durch Acyl-CoA-Oxidase (ACOD) entsteht Wasserstoffperoxid, das zusammen mit Peroxidase 3-Methyl-N-aethyl-N-(6-hydroxyäthyl)-anilin (MEHA) mit 4-Amino-antipyrin oxidativ kondensiert. Die im Photometer bei 520 nm gemessene Extinktion des so entstandenen Farbstoffes ist der Konzentration der FFS in der Probe direkt proportional.

¹⁰ Wako Pure Chemical Industries LTD, Osaka, Japan

3.8 Glucagon

Das für die Glucagonbestimmung im Plasma vorgesehene Blut wurde sofort mit 10% (Vol./Vol.) Trasylol^{®11} versetzt. Dieser Proteasehemmer verhindert den Abbau von Proteohormonen durch Proteasen des Plasmas. Die Blutproben wurden anschliessend bei 4°C und 5000 U/min 10 Minuten zentrifugiert. Danach wurde das Plasma in Plastikcups pipetiert und bei -20°C bis zur Hormonbestimmung aufbewahrt.

Die Glucagonkonzentration der Proben wurde radioimmunologisch gemessen. Dazu wurde ein Radioimmunistest¹² verwendet. Das Prinzip des Tests beruht auf der Konkurrenz des in den Proben enthaltenen Glucagons mit radioaktiv markiertem Glucagon (¹²⁵J) um eine limitierte Menge Antikörper. Diese Antikörper sind spezifisch gegen pankreatisches Glucagon (=Antigen) gerichtet. Bei der Inkubation entsteht ein Reaktionsgleichgewicht, bei dem das Glucagon der Probe und das markierte Glucagon im Verhältnis ihrer Quantitäten an den Antikörper gebunden sind. Danach wird das freie vom gebundenen Glucagon getrennt, indem ein zweiter Antikörper hinzugegeben wird, der spezifisch gegen Immunglobuline gerichtet ist und alle Antigen(Glucagon)-Antikörperkomplexe ausfällt. Diese werden abzentrifugiert. Mit dem Ueberstand wird das freie Glucagon dekantiert. Darauf wird die Aktivität des Präzipitates in einem Gamma-Zähler gemessen. Je höher die Aktivität (markiertes Glucagon), umso weniger Glucagon (nicht markiert) ist in der Probe enthalten. Die gemessene Aktivität ist also umgekehrt proportional zur Plasmaglucagonkonzentration. Mit Standardproben bekannter Glucagonkonzentrationen wird eine Eichkurve erstellt, anhand der sich die unbekannten Glucagonkonzentrationen der Proben ermitteln lassen.

¹¹ Bayer, Leverkusen, BRD, 100'000 KIE/ml

¹² Radioassay Systems Laboratories, Inc., Carson, CA, USA

Der beschriebene Test wurde zur Bestimmung des Glucagongehaltes in Humanplasma entwickelt. Schweineglucagon (für die Herstellung der Eichkurve verwendet) und Rattenglucagon unterscheiden sich aber immunologisch nicht von Humanglucagon[43,60], was die Verwendung des Tests für unsere Messungen erlaubte. Die Spezifität des im Test verwendeten Antikörpers wird vom Hersteller mit folgenden Werten angegeben:

HORMON	% KREUZREAKTION
Pankratisches Glucagon	100.0000
Darm-Glucagon	0.0013
Schweineinsulin	0.0005
Schweinegastrin	0.0005
Menschliches ACTH	0.0002

3.9 Statistik

In den Abbildungen und Tabellen sowie im Text sind die Ergebnisse als Mittelwerte mit dem Standardfehler des Mittelwertes angegeben. Zur Ueberprüfung der Signifikanz von Unterschieden zwischen Gruppenmittelwerten wurden jeweils eine einfaktorielle Varianzanalyse und anschliessend ein modifizierter T-Test[26] oder ein Mittelwertsvergleich nach Scheffé[70] durchgeführt. Dabei bedienten wir uns der zweiseitigen Fragestellung. Als Signifikanzgrenze galt eine Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 %.

Kapitel IV

ERGEBNISSE

4.1 Experiment I:

Einfluss von Glucagon auf die Futteraufnahme und den hepatischen KH-Stoffwechsel bei HF-Ratten

In letzter Zeit mehren sich die Zweifel an der Hypothese, dass Glucagon über seinen glycogenolytischen und hyperglycämischen Effekt Sättigung induziert. In verschiedenen Experimenten wurden Dissoziationen zwischen dem glycogenolytischen/hyperglycämischen Effekt und dem Sättigungseffekt von Glucagon gefunden. So reduzierten Glucagoninjektionen verschiedentlich den Verzehr, ohne gleichzeitig eine signifikante Glycogenolyse oder Hyperglycämie zu bewirken[65,83]. Andererseits führte Glucagon bei scheingefütterten Ratten mit offenen Magen fisteln trotz deutlichem Anstieg der Blutglucosekonzentration in der Vena hepatica zu keiner Verzehrsdepression[21]. Nach unterschiedlicher Futterentzugsdauer fanden Geary et al.[17] sogar eine negative Korrelation zwischen dem verzehrsreduzierenden und dem glycogenolytischen Effekt von Glucagon. Auch bei fettreich gefütterten (HF-) Ratten führte Glucagon zwar zu einer Glycogenolyse und Hyperglycämie, reduzierte den Verzehr aber nicht. Wurde den HF-Ratten vor der Glucagoninjektion für eine Stunde die kohlenhydratreiche (HK-) Diät gefüttert, stellte sich der sättigende Effekt von Glucagon jedoch wieder ein[38].

Von diesen Befunden ausgehend testeten wir in Experiment I, ob eine parenterale Glucose- oder Pyruvatapplikation den Sättigungseffekt von Glucagon bei HF-Ratten ebenfalls wieder herstellt. Ferner wurde

untersucht, ob Pyruvat unter diesen Bedingungen den glycogenolytischen bzw. hyperglycämischen Effekt von Glucagon beeinflusst.

4.1.1 Experiment Ia:

Sättigungseffekt von Glucagon nach Glucosevorbehandlung

4.1.1.1 Versuchsanordnung

Das Experiment wurde mit 30 HF-Ratten mit einem mittleren Körpergewicht von 332 g durchgeführt. Sie waren daran gewöhnt, täglich nur für fünf Stunden zu Beginn der Dunkelphase (11:00-16:00 Uhr) Futter zu erhalten. Am Tag vor dem Versuch wurde die Futteraufnahme von 11:00-16:00 gemessen. Anhand dieses Parameters wurden die Tiere in vier möglichst identische Gruppen eingeteilt. Am eigentlichen Versuchstag erhielten die Ratten wie gewohnt zu Beginn der Dunkelphase (11:00 Uhr) das Futter. Um 13:00 Uhr wurde die Futteraufnahme gemessen und den Ratten entweder NaCl-Lösung (Behandlung I und II, Tab. 4) oder Glucose-Lösung (Behandlung III und IV, Tab. 4) subcutan injiziert. Um 14:00 Uhr wurde wieder die Futteraufnahme gemessen und den Ratten entweder Glucagon- (Behandlung II und IV, Tab. 4) oder Kontrollösung (Behandlung I und III, Tab. 4) intraperitoneal injiziert. Danach wurde die kumulative Futteraufnahme nach 1/2, 1 und 2 Stunden gemessen.

Tabelle 4 zeigt die Gruppeneinteilung sowie den Injektionsplan mit Angaben über Konzentration und Volumen der injizierten Lösungen und die applizierte Dosis.

Das Experiment wurde zweimal wiederholt. Bei der ersten Wiederholung wurde die zweite Injektion (Glucagon und Kontrollösung) vertauscht. Bei der zweiten Wiederholung wurden nur noch die unter Behandlung I und IV aufgeführten Injektionen vorgenommen. Zwischen den Wiederholungen wurde jeweils mindestens für einen Tag pausiert.

Tab. 4: Injektionsplan zu Experiment Ia

Behandlung	n*	1. INJEKTION (s.c., 13:00)		2. INJEKTION (i.p., 14:00)		Inj.-Vol.** (ml)
		Lösung (mol/l)	Dosis (mmol/kg ^{3/4})	Lösung	Glucagondosis (µg/kg ^{3/4})	
I	30	NaCl (1.5)	2.85	Kontroll- lösung	0	1.0
II	15	NaCl (1.5)	2.85	Glucagon	400	1.0
III	15	Glucose (3.0)	5.70	Kontroll- lösung	0	1.0
IV	30	Glucose (3.0)	5.70	Glucagon	400	1.0

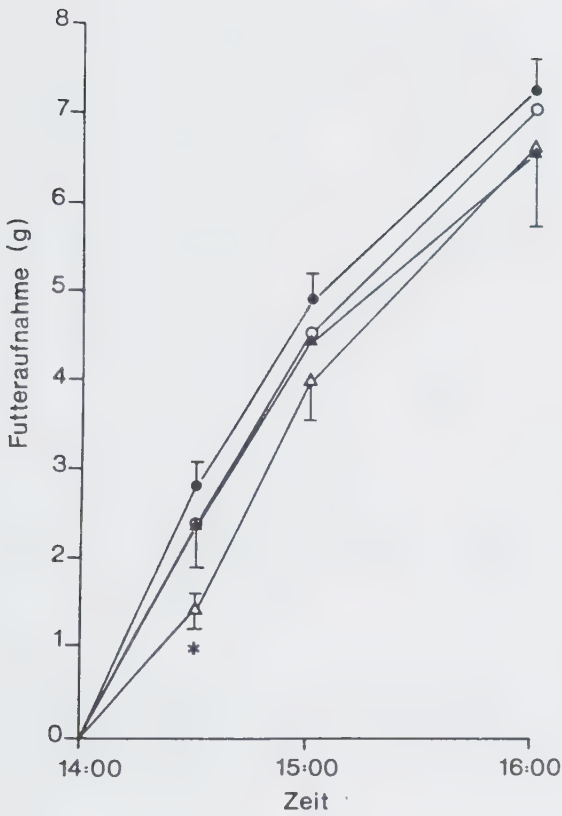
* = Anzahl der Beobachtungen

** = mittleres Injektionsvolumen pro Ratte

4.1.1.2 Ergebnisse

Nach Glucoseinjektion bewirkte Glucagon (Behandlung IV, Abb. 1) gegenüber den andern drei Behandlungen (Behandlung I, II und III, Abb. 1) in der ersten 1/2 Stunde eine signifikante ($p < 0.05$) Verzehrsdepression. Nach NaCl-Injektion reduzierte Glucagon den Verzehr nicht (Behandlung II, Abb. 1). Auch die Glucoseinjektion (Behandlung II, Abb. 1) hatte keinen signifikanten Effekt auf den Verzehr.

Die Futteraufnahme in den zwei Stunden vor der ersten Injektion (11:00-13:00 Uhr) war bei allen Behandlungsgruppen ähnlich: Behandlung I-IV: 8.8 ± 0.4 , 9.5 ± 0.7 , 9.2 ± 0.7 und 9.0 ± 0.3 g. Das gleiche galt für die Zeit zwischen erster und zweiter Injektion (13:00-14:00 Uhr): 2.3 ± 0.3 , 2.9 ± 0.4 , 3.2 ± 0.5 und 2.6 ± 0.3 g.



	Behandlung	1. Injektion s.c.	2. Injektion i.p.
●—●	I	NaCl	Kontrollösung
○—○	II	NaCl	Glucagon
▲—▲	III	Glucose	Kontrollösung
△—△	IV	Glucose	Glucagon

Abb. 1: Einfluss einer Glucagoninjektion auf die Futteraufnahme bei HF-Ratten nach NaCl- oder Glucoseinjektion

4.1.2 Experiment Ib:

Sättigungseffekt von Glucagon nach Pyruvatvorbehandlung

4.1.2.1 Versuchsanordnung

Dieser Versuch wurde wie Experiment Ia durchgeführt. Die 30 HF-Ratten mit einem durchschnittlichen Körpergewicht von 369 g wurden jedoch nur in drei Behandlungsgruppen unterteilt. Die Behandlung II des Experiments Ia (Glucagon- nach NaCl-Injektion) wurde weggelassen, weil Glucagon unter diesen Bedingungen schon in Experiment Ia keinen Effekt auf den Verzehr hatte. Anstelle der Glucoselösung wurde für die erste Injektion Pyruvatlösung verwendet (Tab. 5).

Das Experiment wurde an drei aufeinanderfolgenden Tagen mit jeweils vertauschten Behandlungen durchgeführt.

4.1.2.2 Ergebnisse

Nach Pyruvatinjektion bewirkte Glucagon (Behandlung IV, Abb. 2) gegenüber den beiden andern Behandlungen (I und III, Abb. 2) in der ersten 1/2 Stunde eine signifikante ($p < 0.05$) Verzehrdepression. Die Pyruvatinjektion (Behandlung III, Abb. 2) hatte keinen signifikanten Effekt auf den Verzehr.

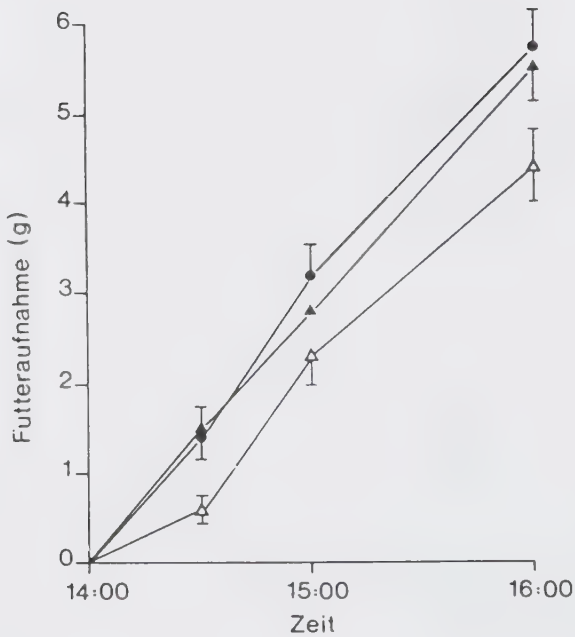
Auch bei diesem Experiment war die Futteraufnahme aller Behandlungsgruppen vor der ersten Injektion (11:00-13:00 Uhr: 7.8 ± 0.3 , 7.4 ± 0.3 , 7.9 ± 0.3 g, Behandlung I-III) und zwischen erster und zweiter Injektion (13:00-14:00 Uhr: 1.5 ± 0.3 , 1.0 ± 0.2 , 0.9 ± 0.2 g) ähnlich.

Tab. 5: Injektionsplan zu Experiment Ib

Behandlung	n*	1. INJEKTION (s.c., 13:00)			2. INJEKTION (i.p., 14:00)		
		Lösung (mol/l)	Dosis (mmol/kg $\frac{1}{4}$)	Inj.-Vol.** (ml)	Lösung	Glucagondosis ($\mu\text{g/kg}$ $\frac{1}{4}$)	Inj.-Vol.** (ml)
I	30	NaCl (2.5)	5.70	1.1	Kontroll- lösung	0	1.0
III	30	Na-Pyruvat (2.5)	5.70	1.1	Kontroll- lösung	0	1.0
IV	30	Na-Pyruvat (2.5)	5.70	1.1	Glucagon	400	1.0

* = Anzahl der Beobachtungen

** = mittleres Injektionsvolumen pro Ratte



	Behandlung	1. Injektion s.c.	2. Injektion i. p.
●—●	I	NaCl	Kontrollösung
▲—▲	III	Pyruvat	Kontrollösung
△—△	IV	Pyruvat	Glucagon

Abb. 2: Einfluss einer Glucagoninjektion auf die Futteraufnahme bei HF-Ratten nach NaCl- oder Pyruvatinjektion

4.1.3 Experiment Ic:

Glycogenolytischer und hyperglycämischer Effekt von Glucagon nach Pyruvatvorbehandlung

4.1.3.1 Versuchsanordnung

Unter den gleichen Bedingungen wie in Experiment Ia bzw. Ib wurde in Experiment Ic (Tab. 6) der Einfluss der Pyruvatvorbehandlung auf den glycogenolytischen und hyperglycämischen Effekt von Glucagon untersucht. Dazu wurden den 30 Ratten (durchschnittliches Körpergewicht: 373 g) 15 Minuten nach der zweiten Injektion Blut- und Leberproben entnommen (vgl. Abschnitte 3.4 und 3.6).

Das Experiment wurde an drei aufeinanderfolgenden Tagen mit jeweils 10 Tieren durchgeführt.

4.1.3.2 Ergebnisse

Glucagon bewirkte gegenüber der Kontrollinjektion sowohl nach NaCl- wie auch nach Pyruvatinjektion (Behandlung II und IV) eine signifikante ($p < 0.05$) Abnahme des Leberglycogenspiegels (Abb. 3) und eine signifikante ($p < 0.05$) Erhöhung der Blutglucosekonzentrationen in der Vena hepatica und Vena portae (Abb. 4).

Die Pyruvatinjektion (Behandlung III) erhöhte den Leberglycogenspiegel sichtlich gegenüber NaCl-Injektion (Behandlung I, Abb. 3). Der Unterschied war aber nicht signifikant.

Tab. 6: Injektionsplan zu Experiment Ic

Behandlung	n*	1. INJEKTION (s.c., 13:00)			2. INJEKTION (i.p., 14:00)		
		Lösung (mol/l)	Dosis (mmol/kg ^{3/4})	Inj.-Vol.** (ml)	Lösung	Glucagondosis (µg/kg ^{3/4})	Inj.-Vol.** (ml)
I	7	NaCl (2.5)	5.70	1.1	Kontrolllösung	0	1.0
II	9	NaCl (2.5)	5.70	1.1	Glucagon	400	1.0
III	6	Na-Pyruvat (2.5)	5.70	1.1	Kontrolllösung	0	1.0
IV	8	Na-Pyruvat (2.5)	5.70	1.1	Glucagon	400	1.0

* = Anzahl der Beobachtungen

** = mittleres Injektionsvolumen pro Ratte

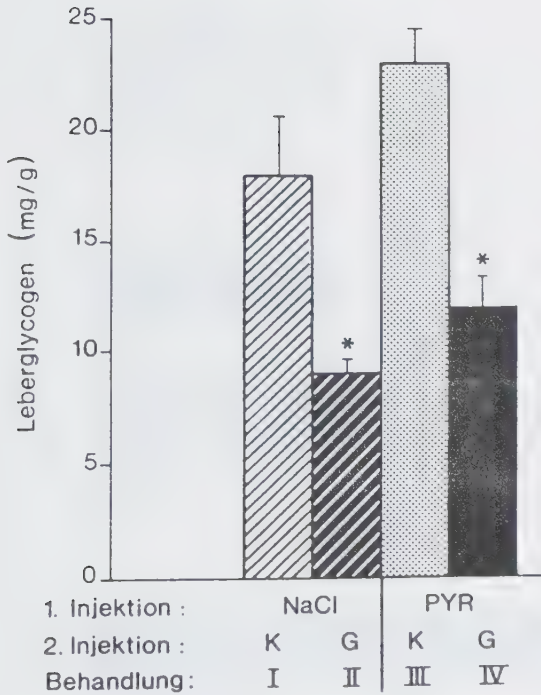


Abb. 3: Einfluss einer Glucagoninjektion (G) auf den Leberglycogengehalt bei HF-Ratten nach NaCl- oder Pyruvatinjektion

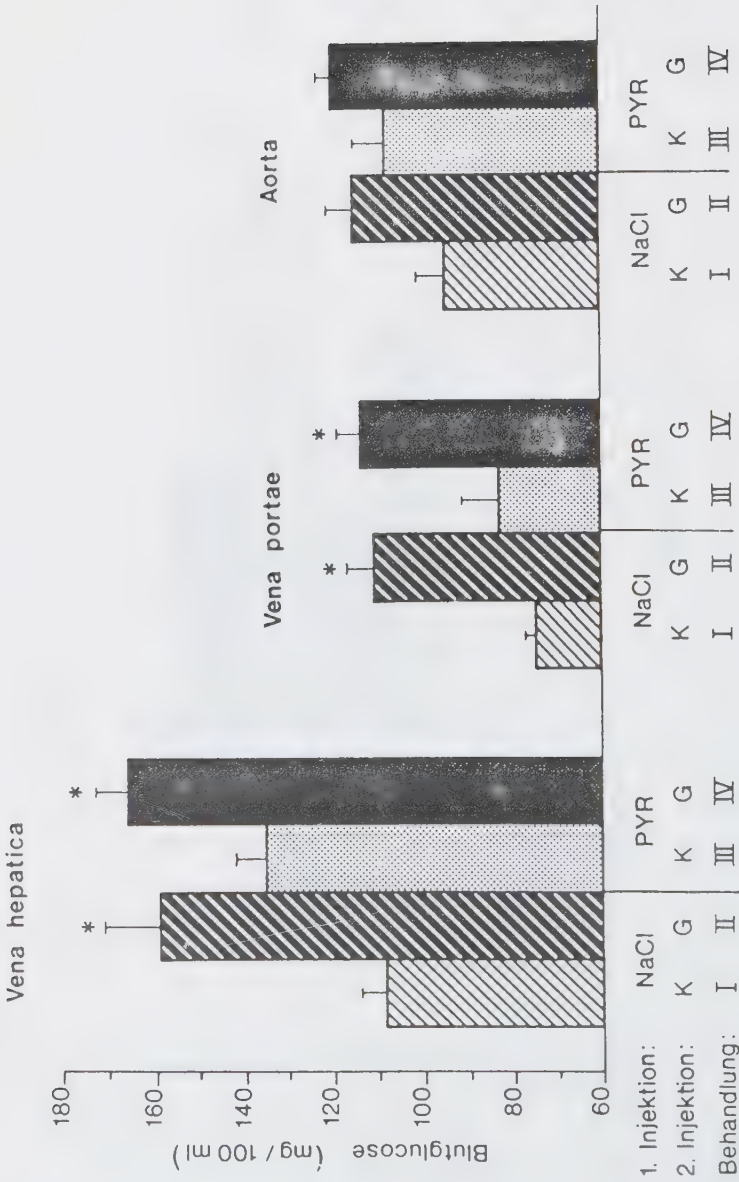


Abb. 4: Einfluss einer Glucagoninjektion (G) auf den Blutglucosespiegel bei HF-Ratten nach NaCl- oder Pyruvatinjektion

4.2 Experiment II:

Einfluss von Mercaptoacetat (MA) auf den verzehrsreduzierenden und hyperglycämischen Effekt von Glucagon bei HK-Ratten

Die Ergebnisse von Experiment I unterstützen die Annahme, dass der verzehrsreduzierende Effekt von Glucagon nicht auf seiner glycolytischen und hyperglycämischen Wirkung beruht.

Glucagon stimuliert in der Leber neben der Glycogenolyse[76] und Gluconeogenese[8] die Proteolyse und die Harnstoffbildung[2] sowie die Ketogenese und die β -Oxidation der freien Fettsäuren (FS)[14,51]. Letztere scheint ein Sättigungssignal auszulösen, denn eine Hemmung der FS-Oxidation durch MA führt unter bestimmten Bedingungen zu einer Verzehrssteigerung[73]. Es ist deshalb möglich, dass Glucagon über die Stimulation der FS-Oxidation verzehrsreduzierend wirkt.

In Experiment II prüften wir deshalb, ob eine Hemmung der FS-Oxidation durch MA den verzehrsreduzierenden Effekt von Glucagon bei HK-Ratten beeinflusst. Ferner wurde untersucht, ob MA den glycolytischen bzw. hyperglycämischen Effekt von Glucagon beeinflusst. Die Plasmakonzentrationen der freien FS wurden ebenfalls gemessen.

4.2.1 Experiment IIa:

Einfluss von Mercaptoacetat (MA) auf den verzehrsreduzierenden Effekt von Glucagon bei HK-Ratten

4.2.1.1 Versuchsanordnung

Für dieses Experiment wurden 29 HK-Ratten mit einem durchschnittlichen Körpergewicht von 386 g verwendet. Am Abend vor dem Versuch wurde den Ratten zu Beginn der Hellphase (23:00 Uhr) das Futter entzogen. Nach 12 Stunden, zu Beginn der Dunkelphase, wurde den Ratten entweder 300 μ mol MA pro kg metabolisches Körpergewicht (kg^{3M}) oder physiologische NaCl-Lösung als Kontrolle intraperitoneal

injiziert (Tab. 7). Zehn Minuten nach dieser Injektion erhielten die Ratten ihr Futter und zu Beginn der ersten Mahlzeit wurde ihnen entweder 400 µg Glucagon pro kg metabolisches Körpergewicht(kg^{3M}) oder Kontrollösung intraperitoneal injiziert (Tab. 7). Die Grösse und Dauer der unmittelbar folgenden Mahlzeit wurden gemessen. Der Versuch wurde insgesamt viermal im Abstand von jeweils 3-7 Tagen mit vertauschten Gruppen durchgeführt.

4.2.1.2 Ergebnisse

Nach NaCl-Injektion reduzierte Glucagon gegenüber der Kontrollinjektion (Behandlung II gegenüber Behandlung I, Abb. 5) die Grösse und Dauer der ersten Mahlzeit in der Dunkelphase signifikant ($p < 0.05$). Nach MA-Injektion hatte Glucagon gegenüber der Kontrollinjektion (Behandlung IV gegenüber Behandlung III, Abb. 5) keinen signifikanten Effekt auf Grösse und Dauer der ersten Mahlzeit. MA (Behandlung III) reduzierte die Grösse, aber nicht die Dauer der ersten Mahlzeit gegenüber Behandlung I (Abb. 5).

Tab. 7: Injektionsplan zu Experiment IIIa und IIb

Behandlung	n*	1. INJEKTION (i.p., 11:00)			2. INJEKTION (i.p., 11:10)		
		Lösung (mol/l)	Dosis (μ mol/kg ^{3/4})	Inj.-Vol.** (ml)	Lösung	Glucagondosis (μ g/kg ^{3/4})	Inj.-Vol.** (ml)
I	28	NaCl (0.15)	300	1.0	Kontroll- lösung	0	1.0
II	27	NaCl (0.15)	300	1.0	Glucagon	400	1.0
III	28	Na-MA*** (0.15)	300	1.0	Kontroll- lösung	0	1.0
IV	26	Na-MA*** (0.15)	300	1.0	Glucagon	400	1.0

* = Anzahl der Beobachtungen
 ** = mittleres Injektionsvolumen pro Ratte
 *** = Mercaptoacetat

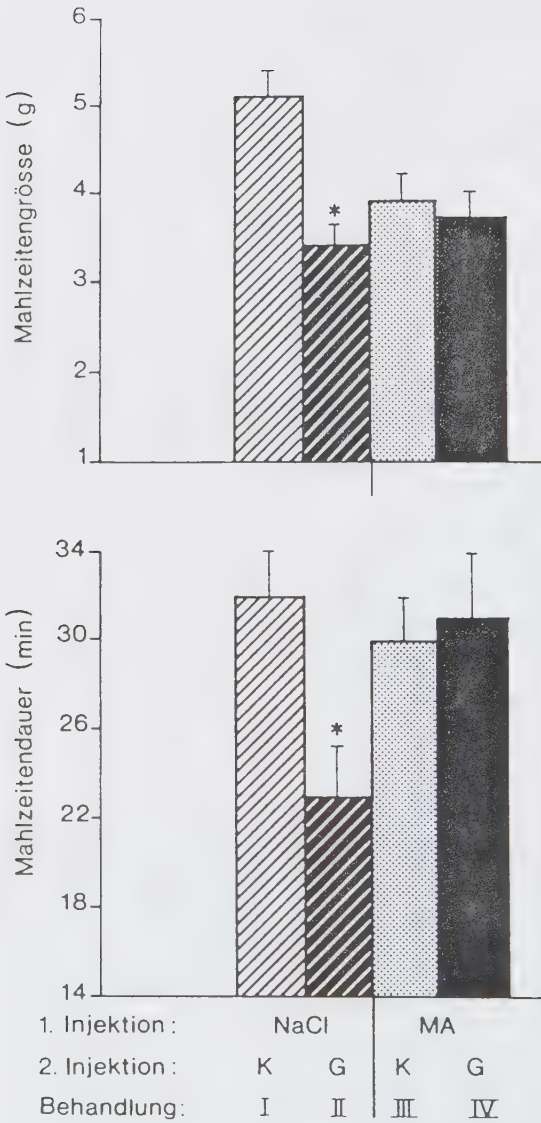


Abb. 5: Einfluss einer Glucagoninjektion (G) auf die Futteraufnahme bei HK-Ratten nach NaCl- oder Mercaptoacetatinjektion (MA)

4.2.2 Experiment IIb:

Einfluss von Mercaptoacetat (MA) auf den hyperglycämischen Effekt von Glucagon bei HK-Ratten

4.2.2.1 Versuchsanordnung

Unter den gleichen Bedingungen wie in Experiment IIa (Tab. 7) wurden 15 Minuten nach der zweiten Injektion von 28 Ratten (durchschnittliches Körpergewicht: 397 g) Blutproben zur Bestimmung der Blutglucosekonzentration und der Plasmakonzentration der freien FS, sowie Leberproben zur Bestimmung des Leberglycogengehaltes entnommen (vgl. Abschnitte 3.4-3.7)

4.2.2.2 Ergebnisse

Nach NaCl-Injektion erniedrigte Glucagon den Leberglycogenspiegel gegenüber der Kontrollinjektion (Behandlung II gegenüber Behandlung I) signifikant ($p < 0.05$) (Abb. 6). Nach MA-Injektion führte Glucagon (Behandlung IV) ebenfalls zu einer Abnahme des Leberglycogens. Der Unterschied zur Behandlung III war aber nicht signifikant (Abb. 6).

Sowohl nach NaCl- als auch nach MA-Injektion erhöhte Glucagon den Blutglucosespiegel in der Vena hepatica (Abb. 7). Der jeweilige Unterschied war aber ebenfalls nicht signifikant. Bei der Behandlung III war die Blutglucosekonzentration in der Pfortader signifikant ($p < 0.05$) niedriger als bei den anderen drei Behandlungen (Abb. 7). Dies könnte auf eine Hemmung der Magenentleerung oder der Glucoseresorption durch MA hindeuten. Die Plasmakonzentration der freien FS in Vena hepatica, Vena portae und Aorta war bei allen vier Behandlungen nicht signifikant verschieden (Abb. 8). Eine signifikante ($p < 0.05$) Erhöhung der freien FS nach MA-Injektion ergab sich jedoch, wenn jeweils alle NaCl- (Behandlung I und II) und alle MA-injizierten Tiere (Behandlung III und IV) zusammengefasst wurden (Abb. 9).

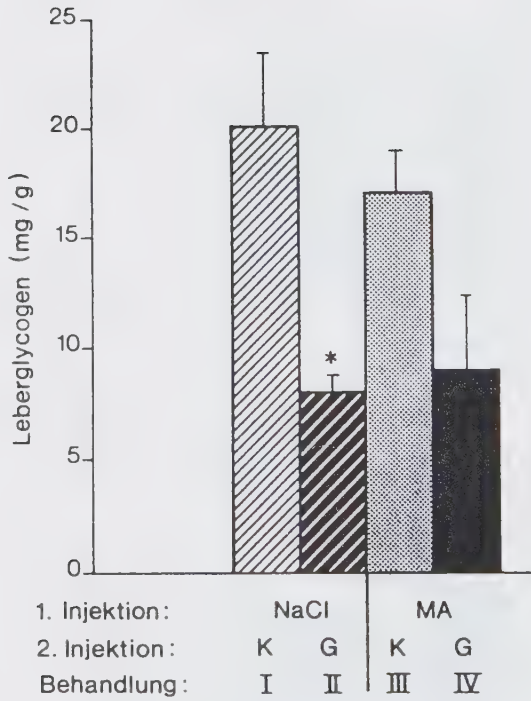


Abb. 6: Einfluss einer Glucagoninjektion (G) auf den Leberglycogengehalt bei HK-Ratten nach NaCl- oder Mercaptoacetatinjektion (MA)

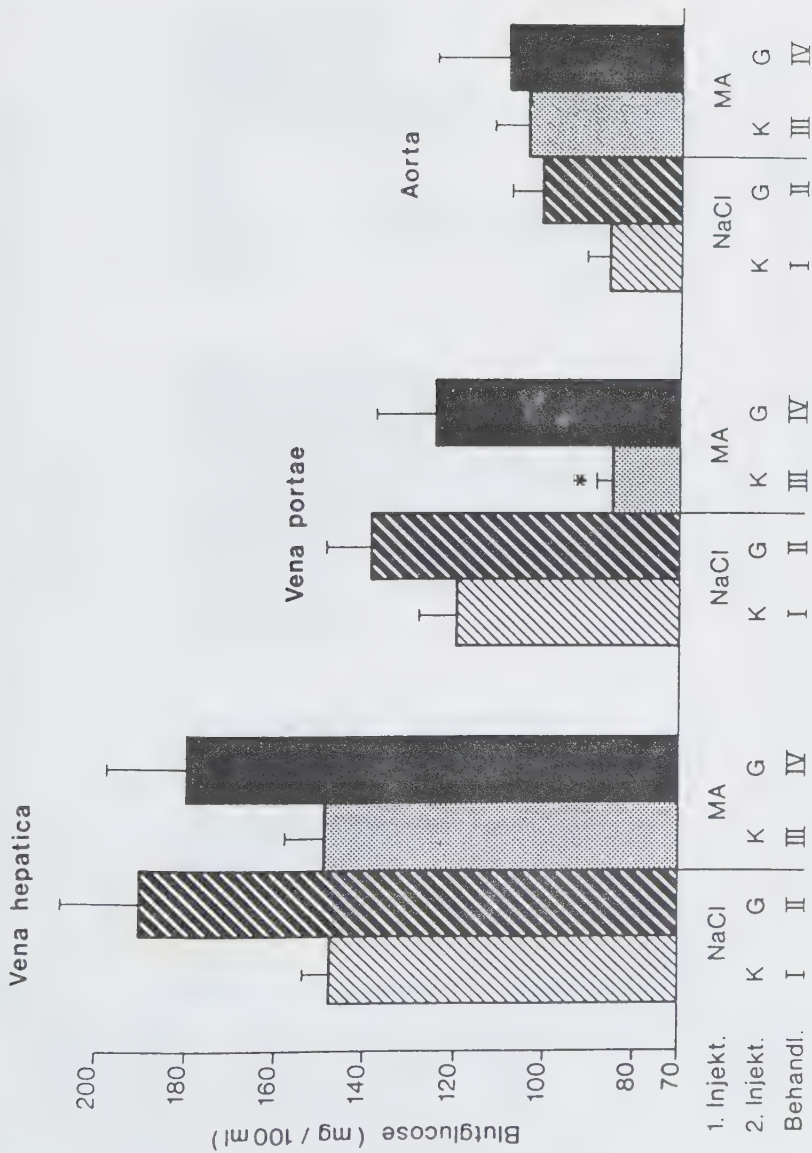


Abb. 7: Einfluss einer Glucagoninjektion (G) auf die Blutglucosekonzentration bei HK-Ratten nach NaCl- oder Mercaptoacetatinjektion (MA)

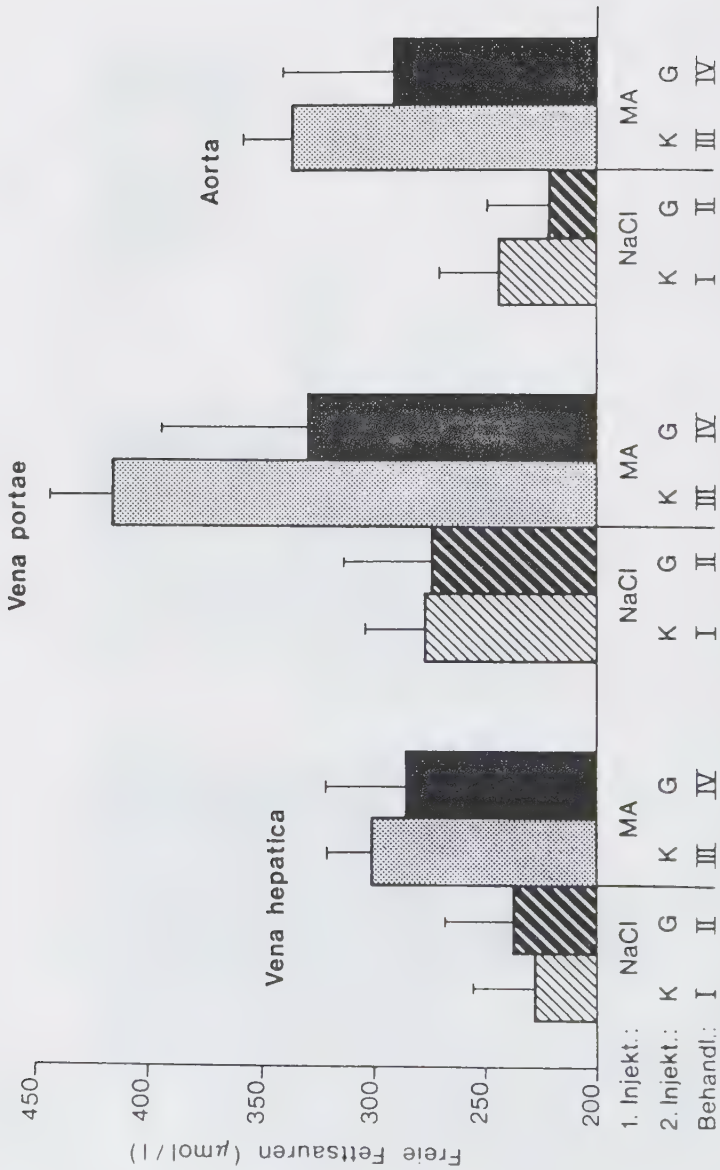


Abb. 8: Einfluss einer Glucagoninjektion (G) auf die Plasmakonzentration der Freien Fettsäuren bei HK-Ratten nach NaCl- oder Mercaptoacetatinjektion (MA)

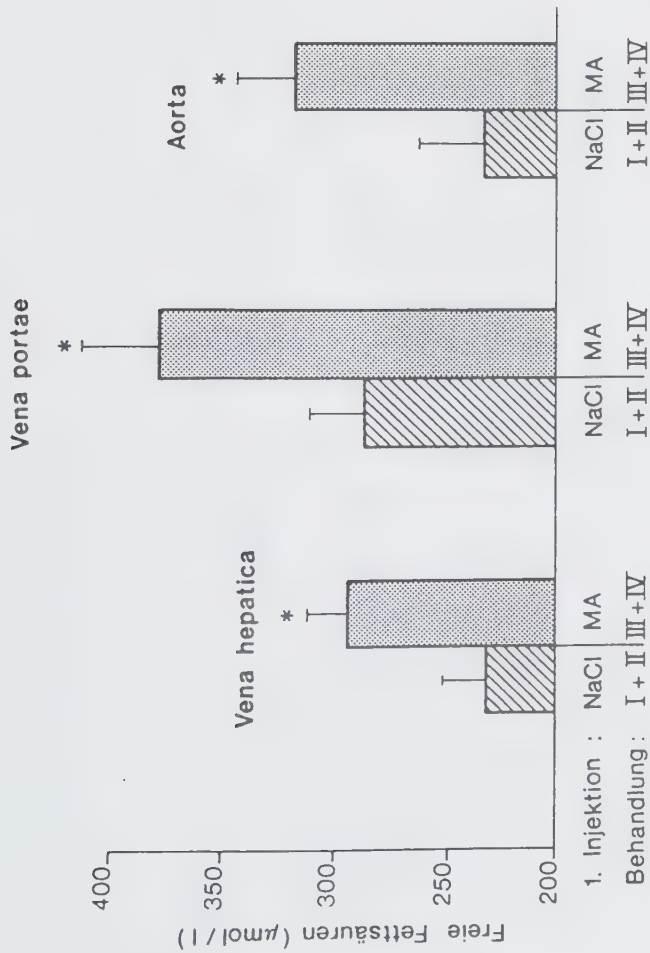


Abb. 9: Einfluss einer Mercaptoacetatinjektion (MA) auf die Plasmakonzentration der Freien Fettsäuren bei HK-Ratten

4.3 Experiment III:

Einfluss von Ouabain auf den verzehrsreduzierenden Effekt von Glucagon bei HK-Ratten

Es wird vermutet, dass Veränderungen des Membranpotentials von innervierten Leberzellen an der Regulation der Nahrungsaufnahme beteiligt sind[68]. Der Sättigungseffekt von Glucagon könnte somit auch auf einer Veränderung des Membranpotentials beruhen, da bekannt ist, dass Glucagon die Leberzellmembran hyperpolarisiert[15,16,24,66,75,86]. Möglicherweise ist die Stimulation der Na^+/K^+ -ATPase durch Glucagon dafür verantwortlich[33]. Wird die Na^+/K^+ -ATPase durch Ouabain gehemmt, verhindert dies die durch Glucagon induzierte Hyperpolarisation der Leberzellmembran[66]. In Experiment III wurde deshalb geprüft, ob Ouabain den verzehrsreduzierenden Effekt von Glucagon beeinflusst.

4.3.1.1 Versuchsanordnung

Den 28 HK-Ratten (durchschnittliches Körpergewicht: 479 g) dieses Versuches wurde ebenfalls in der unmittelbar vorangehenden Hellphase (23:00-11:00 Uhr) für 12 Stunden das Futter entzogen. Um 11:00 Uhr wurde den Ratten entweder 1.2 mg Ouabain (gelöst in physiologischer NaCl-Lösung) pro kg metabolisches Körpergewicht oder physiologische NaCl-Lösung intraperitoneal injiziert (Tab 8). Um 11:30 Uhr erhielten die Ratten das Futter wieder, und es wurde ihnen 400 µg Glucagon pro kg metabolisches Körpergewicht oder Kontrollösung intraperitoneal injiziert (Tab. 8). Dreissig Minuten nach der zweiten Injektion wurde die Futteraufnahme gemessen. Der Versuch wurde nach 4 Tagen wiederholt, wobei die 2. Injektion vertauscht wurde.

Tab. 8: Injektionsplan zu Experiment III

Behandlung	n*	1. INJEKTION (i.p., 11:00)			2. INJEKTION (i.p., 11:30)		
		Lösung	Ouabain-dosis (mg/kg ^{3/4})	inj.-Vol. (ml)	Lösung	Glucagondosis (µg/kg ^{3/4})	inj.-Vol. (ml)
I	14	NaCl (physiol.)	0	0.86	Kontroll-lösung	0	1.0
II	14	NaCl (physiol.)	0	0.86	Glucagon	400	1.0
III	14	Ouabain	1.2	0.86	Kontroll-lösung	0	1.0
IV	14	Ouabain	1.2	0.86	Glucagon	400	1.0

* = Anzahl der Beobachtungen

** = mittleres Injektionsvolumen pro Ratte

4.3.1.2 Ergebnisse

Nach NaCl-Injektion reduzierte Glucagon die Futteraufnahme gegenüber der Kontrollinjektion signifikant ($p < 0.05$) (Behandlung II gegenüber Behandlung I, Abb. 10). Nach Ouabaininjektion hatte Glucagon hingegen keinen signifikanten Effekt auf den Verzehr (Behandlung IV gegenüber Behandlung III, Abb. 10).

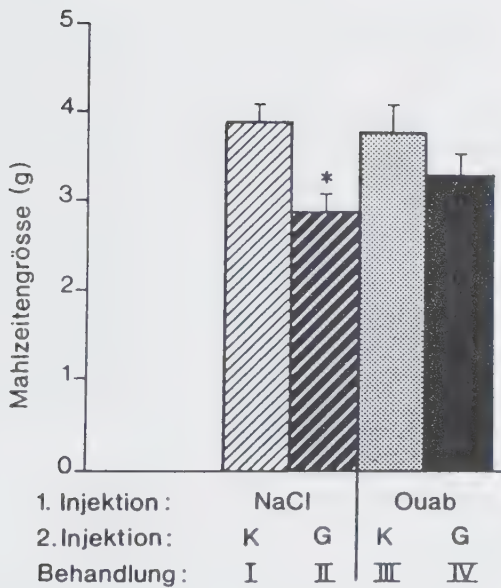


Abb. 10: Einfluss einer Ouabaininjektion (Ouab) auf den verzehrsreduzierenden Effekt von Glucagon (G) bei HK-Ratten

4.4 Experiment IV:

Einfluss von Glucagoninjektionen auf die Plasmagluconkonzentrationen bei HK-Ratten

Unter unseren Versuchsbedingungen reduzierte bei HK-Ratten nur die relativ hohe Glucagondosis von 400 µg pro kg metabolisches KG sicher den Verzehr.

In Experiment IV wurde daher die Plasmagluconkonzentration nach Injektion dieser Glucagondosis sowie auch niedrigerer Glucagondosen (200 oder 50 µg Glucagon pro kg metabolisches Körpergewicht) gemessen. Die Blutglucosekonzentration und der Leberglycogengehalt wurden ebenfalls erfasst.

Zweihundert µg Glucagon pro kg metabolisches Körpergewicht ist die niedrigste Dosis die unter unseren Bedingungen in an dieser Stelle nicht näher beschriebenen Experimenten den Verzehr signifikant reduzierte. Fünfzig µg Glucagon pro kg metabolisches Körpergewicht liegt im Bereich der niedrigsten Glucagondosis, die in Untersuchungen anderer Autoren jemals den Verzehr verminderte[20].

4.4.1

4.4.1.1 Versuchsanordnung

Die 55 Ratten dieses Versuches erhielten die HK-Diät. Das durchschnittliche Körpergewicht der Tiere betrug 511 g. Wie in Experiment II und III erhielten die Ratten nach einem einmaligen 12-stündigen Futterentzug in der Hellphase (23:00-11:00 Uhr) zu Beginn der Dunkelphase (11:00 Uhr) ihr Futter wieder. Zu diesem Zeitpunkt wurde ihnen 50, 200 oder 400 µg Glucagon pro kg metabolisches Körpergewicht oder Kontrollösung intraperitoneal injiziert. Fünfzehn Minuten nach der Injektion wurden den Ratten Blut- und Leberproben entnommen (vgl. Abschnitte 3.4 und 3.6). Das Experiment wurde an vier aufeinanderfolgenden Tagen mit jeweils 14 bzw. 13 Tieren durchgeführt.

4.4.1.2 Ergebnisse

Bereits die niedrigste injizierte Glucagondosis (50 µg/kg metabolisches Körpergewicht) erhöhte die Plasmaglucagonkonzentration gegenüber der Kontrollinjektion etwa um das zehnfache (Tab. 9). Bei der höchsten Glucagondosis (400 µg/kg metabolisches Körpergewicht) war der Anstieg der Plasmaglucagonkonzentration noch wesentlich stärker ausgeprägt (Tab. 9). Bei allen Glucagondosen ergab sich eine annähernd gleiche Differenz zwischen der Glucagonkonzentration in der Vena portae und in der Vena hepatica. Alle Glucagondosierungen reduzierten gegenüber der Kontrollinjektion den Leberglycogenspiegel signifikant ($p < 0.05$) (Abb. 11) und erhöhten die Blutglucosekonzentration in Vena hepatica und Vena portae. Signifikant ($p < 0.05$) war die Hyperglycämie jedoch nur in der Vena hepatica (Abb. 12). Die Differenz der Glucosekonzentrationen zwischen Vena hepatica und Vena portae blieb dabei unverändert.

Tab. 9: Einfluss von Glucagoninjektionen unterschiedlicher Dosis auf die Plasmagluconkonzentration (pg/ml)

Glucagon- dosis ($\mu\text{g}/\text{kg}^{3/4}$)	Vena hepatica	Vena portae	Aorta
0	301 $\pm$ 79 ¹⁾	447 $\pm$ 112 ¹⁾	209 $\pm$ 13 ¹⁾
50	3508 $\pm$ 956 ²⁾	3796 $\pm$ 817 ²⁾	3312 $\pm$ 831 ²⁾
200	2756 $\pm$ 819 ²⁾	2881 $\pm$ 765 ²⁾	2109 $\pm$ 488 ²⁾
400	12308 $\pm$ 3169 ³⁾	13023 $\pm$ 3155 ³⁾	14567 $\pm$ 3517 ³⁾

¹⁾, ²⁾, ³⁾: unterschiedliche Indexzahlen bezeichnen signifikante ($p < 0.001$) Unterschiede der Gruppenmittelwerte

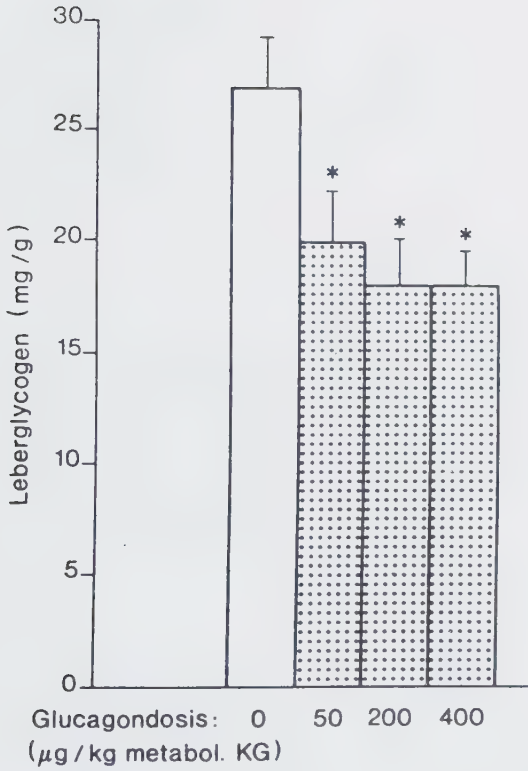


Abb. 11: Einfluss von Glucagoninjektionen unterschiedlicher Dosis auf den Leberglycogengehalt bei HK-Ratten

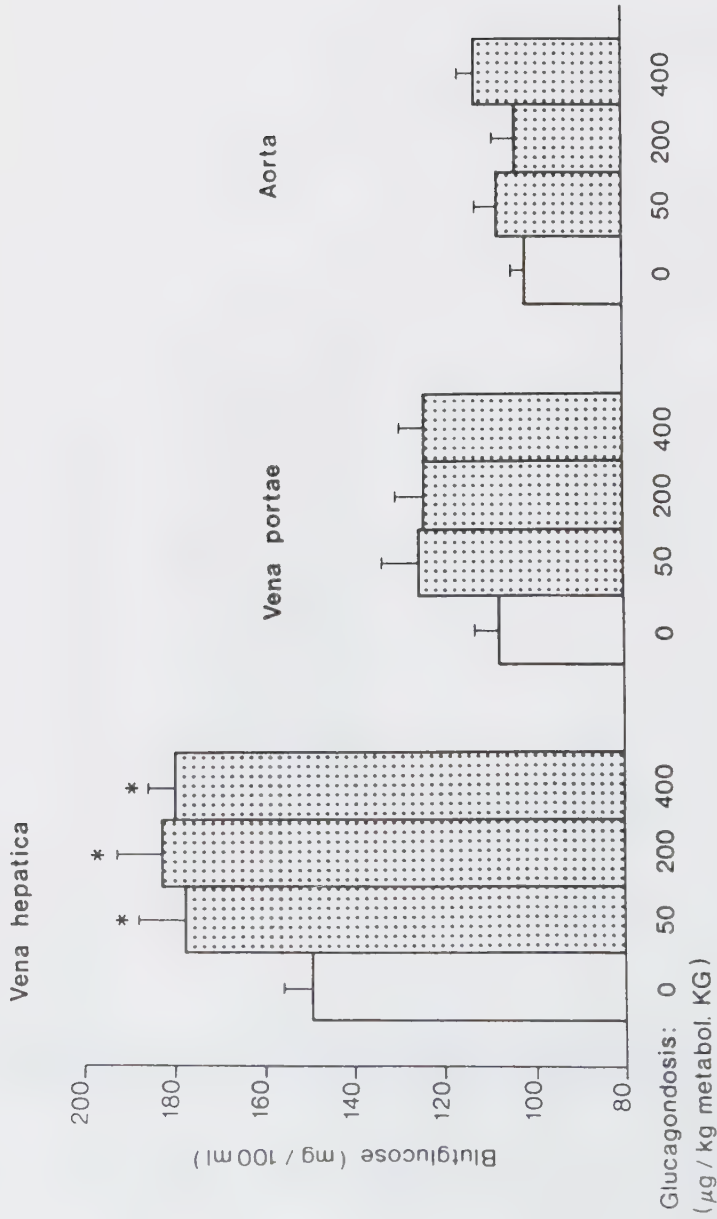


Abb. 12: Einfluss von Glucagoninjektionen unterschiedlicher Dosis auf die Blutglucosekonzentration bei HK-Ratten

Kapitel V

DISKUSSION

Es wurde mehrfach gezeigt, dass die Injektion von pankreatischem Glucagon den Verzehr bei unterschiedlichen Spezies reduziert[3,6,13,18,20,35,45,63,65,69,83,84,85], und dass die Plasmagluconkonzentration im Verlauf spontaner Mahlzeiten ansteigt[9,11,23,27,31,37,54,81]. Wurden vor einer Mahlzeit spezifische gegen Glucagon gerichtete Antikörper intraperitoneal injiziert, nahmen Grösse und Dauer der betreffenden Mahlzeit zu[40]. Diese Befunde weisen darauf hin, dass pankreatisches Glucagon am Zustandekommen der Sättigung beteiligt ist. Wie Glucagon sättigend wirkt, ist jedoch noch weitgehend unklar. Wie bereits erwähnt, wurde die fast 30 Jahre lang vorherrschende Ansicht, Glucagon induziere über seinen glycogenolytischen bzw. hyperglycaemischen Effekt Sättigung, in letzter Zeit mehrfach in Frage gestellt[17,21,38,65].

In einer neueren Untersuchung reduzierte Glucagon nach intraperitonealer Injektion den Verzehr bei fettreich gefütterten (HF-) Ratten nicht. Im gleichen Experiment hemmte Glucagon jedoch den Verzehr, wenn den HF-Ratten vor der Injektion für eine Stunde eine kohlenhydratreiche (HK-) Diät angeboten wurde. Im Einklang mit diesen Resultaten führte Glucagon in Experiment I bei HF-Ratten zu keiner Verzehrsdepression. Der verzehrsreduzierende Effekt von Glucagon konnte jedoch wieder hergestellt werden, wenn den Ratten vor der Glucagoninjektion entweder Glucose oder Pyruvat subcutan injiziert wurde. Die rasche Wiederherstellung des verzehrsreduzierenden Effektes von Glucagon durch eine Glucose- oder Pyruvatinjektion weist darauf hin, dass Glucagon den Verzehr über einen Stoffwechseleffekt

reduziert, und dass es sich dabei um einen spezifischen Sättigungseffekt und nicht um einen unspezifischen Effekt, beispielsweise um eine Geschmacksaversion[20], handelt. Die Ergebnisse von Experiment I zeigen ferner, dass Glucagon nicht selektiv die Aufnahme von Kohlenhydraten hemmt. Dies ist interessant, weil es offenbar nährstoffspezifische Sättigungsmechanismen gibt[58].

Die subcutane Pyruvatinjektion stellte zwar den verzehrsreduzierenden Effekt von Glucagon wieder her, beeinflusste dessen glycogenolytischen Effekt jedoch nicht. Dies ist ein weiterer Hinweis darauf, dass Glucagon nicht über den glycogenolytischen Effekt Sättigung induziert, wie früher vermutet wurde[18,34,45,84].

Bei HF-Ratten scheint eine ausgeprägte Hyperglycämie den Verzehr zu reduzieren[19]. Dennoch ist es unwahrscheinlich, dass die Verzehrdepression durch Glucagon nach vorausgegangener Pyruvatinjektion in Experiment I durch die Hyperglycämie bedingt war. Der Blutglucosespiegel war nämlich nach Glucagoninjektion im Anschluss an eine Pyruvatinjektion nicht signifikant höher als nach Glucagoninjektion unter Kontrollbedingungen.

Da Glucagon den Verzehr offenbar nicht über eine gesteigerte Glycogenolyse oder Hyperglycämie hemmt, dürfte ein anderer Stoffwechseleffekt für die Sättigungswirkung von Glucagon verantwortlich sein. In diesem Zusammenhang könnte der Einfluss von Glucagon auf den Fettstoffwechsel von besonderer Bedeutung sein. Es ist bekannt, dass Glucagon in der Leber die β -Oxidation der Fettsäuren (FS) stimuliert, vor allem indem es das Enzym Acetyl-CoA-Carboxylase und damit die Bildung von Malonyl-CoA aus Acetyl-CoA hemmt[14]. Malonyl-CoA selbst hemmt wiederum das Enzym Carnitin-Palmitoyl-Transferase I, das die FS im Zytoplasma mit Carnitin verestert[14]. Nur die FS-Carnitinerester können die Mitochondrienmembran passieren und damit der Fettsäureoxidation im Mitochondrium zugeführt werden[51,14]. Eine Erniedrigung der Malonyl-CoA-Konzentration durch Glucagon führt

damit zu einer indirekten Stimulierung der FS-Oxidation. Daneben stimuliert Glucagon die FS-Oxidation jedoch auch direkt, indem es die Carnitin-Palmitoyl-Transferase I aktiviert[14].

Kürzlich wurde gezeigt, dass eine Hemmung der FS-Oxidation bei Ratten unter bestimmten Fütterungsbedingungen mit einer Zunahme der Verzehrs einhergeht[73]. Dies lässt vermuten, dass die Oxidation von FS ein Sättigungssignal auslöst. Es ist demnach möglich, dass Glucagon den Verzehr über die Stimulation der FS-Oxidation hemmt. Auch die Wiederherstellung des verzehrsreduzierenden Effektes von Glucagon bei HF-Ratten durch Glucose- oder Pyruvatinjektion steht im Einklang mit dieser Annahme. Man kann davon ausgehen, dass bei HF-Ratten die FS-Oxidation maximal aktiviert ist. Nach Lactat-[14] bzw. Pyruvat- und vermutlich auch nach Glucoseapplikation steigt die Malonyl-CoA-Konzentration an, und die FS-Oxidation wird gehemmt. Es ist deshalb denkbar, dass Glucagon die FS-Oxidation bei HF-Ratten nur nach vorangegangener Hemmung derselben durch Glucose oder Pyruvat wieder stimulieren und damit den Verzehr reduzieren kann.

In neueren Untersuchungen wurde gezeigt, dass die Injektion von Mercaptoacetat (MA) bei Ratten unter bestimmten Fütterungsbedingungen eine Verzehrssteigerung bewirkt[73]. MA blockiert die Acyl-CoA-Dehydrogenasen und hemmt damit den ersten Schritt der mitochondrialen FS-Oxidation[4,5].

In Experiment II blieb der verzehrsreduzierende Effekt von Glucagon bei HK-Ratten nach MA-Injektion aus. Dies steht im Einklang mit der Annahme, dass Glucagon über die Stimulierung der FS-Oxidation den Verzehr hemmt. Mit dieser Annahme lassen sich auch andere Befunde erklären, denen zufolge Faktoren, die den Fettstoffwechsel beeinflussen, wie die Dauer eines Futterentzugs[17], die Tageszeit[17] und der Fettgehalt des Futters[38] auch den Sättigungseffekt von Glucagon beeinflussen.

Der glycogenolytische und hyperglycämische Effekt von Glucagon wurde durch MA nicht beeinflusst, was wiederum dagegen spricht, dass Glucagon über diese Effekte den Verzehr reduziert.

Die Verkleinerung der Mahlzeit nach MA-Injektion in Experiment II scheint im Widerspruch zur oben erwähnten Verzehrssteigerung durch MA zu stehen. Die durch MA induzierte Verzehrssteigerung beruht jedoch nicht auf einer Vergrößerung der einzelnen Mahlzeiten, sondern auf einer starken Verkürzung der Mahlzeitenintervalle[39]. Die einzelnen Mahlzeiten waren dabei eher kleiner, was wahrscheinlich auf einer durch MA induzierten Geschmacksaversion beruht (unveröffentlichte Ergebnisse). Wie in einer früheren Untersuchung[73], erhöhte MA in Experiment II den Plasmaspiegel der freien FS, was vermuten lässt, dass MA die FS-Oxidation auch unter unseren Bedingungen hemmte.

In vielen Untersuchungen wurde gezeigt, dass Glucagon die Leberzellmembran hyperpolarisiert[15,16,24,66,75,86]. Dieser Effekt beruht vor allem auf einer Stimulation der Na^+/K^+ -ATPase durch Glucagon[33]. Ouabain, ein Inhibitor der Na^+/K^+ -ATPase, führt hingegen zu einer Reduktion des Zellmembranpotentials[66].

Die teilweise Aufhebung des verzehrsreduzierenden Effektes von Glucagon bei HK-Ratten durch Ouabain in Experiment III lässt demnach vermuten, dass die Stimulation der Na^+/K^+ -ATPase und die Hyperpolarisation der Leberzellmembran durch Glucagon, unabhängig vom zugrundeliegenden Stoffwechseleffekt, am Sättigungseffekt von Glucagon ursächlich beteiligt sind.

Versuche von Nijima[56,57] zeigten ferner, dass die Aktionspotentialfrequenz (APF) in afferenten hepatischen Vagusfasern nach einer intraportalen Glucagon-, Glucose- oder Pyruvatinjektion abnimmt. Die Abnahme der APF nach Glucoseinfusion konnte durch Ouabain gehemmt werden[56], was darauf hindeutet, dass der betreffende Effekt von der Stimulation der Na^+/K^+ -ATPase abhängt. Die intraportale Infusion

des Glucoseantimetaboliten 2-Desoxy-Glucose (2DG) erhöhte hingegen die APF in afferenten hepatischen Vagusfasern[57]. Ferner wurde gezeigt, dass eine intraportale 2DG-Infusion den Verzehr stimuliert, und dass die Verzehrssteigerung durch eine Vagotomie vermindert wird[59].

Alle diese Befunde deuten darauf hin, dass die Stimulation der Na^+/K^+ -ATPase und die Hyperpolarisation der Leberzellmembran zu einer Abnahme der APF in den afferenten Vagusfasern und damit zu Sättigung führen. Die Aktivität der Na^+/K^+ -ATPase könnte dabei von der Oxidation unterschiedlicher energieliefernder Substrate abhängig sein[35]. In diesem Zusammenhang ist interessant, dass bei Ratten die intraperitoneale Injektion von Ouabain unter bestimmten Bedingungen zu einer Verzehrssteigerung führte (unveröffentlichte Ergebnisse). Es ist daher denkbar, dass die Stimulation der Na^+/K^+ -ATPase durch den oxidativen Stoffwechsel der Leber und die daraus resultierende Hyperpolarisation der Leberzellmembran über eine Abnahme der Aktionspotentialfrequenz vagaler Afferenzen den Verzehr hemmt. Auch Glucagon könnte auf diese Weise über die Stimulation der FS-Oxidation Sättigung induzieren.

Bisher nahm man immer an, dass die Verzehrsdepression nach Glucagoninjektion einen physiologischen Sättigungseffekt von Glucagon widerspiegelt. Der Plasmaglucagonspiegel nach Glucagoninjektionen, die den Verzehr reduzierten, wurde beim Monogastrier bisher jedoch nicht gemessen.

Die Ergebnisse des Experiments IV zeigen, dass Glucagondosen, die den Verzehr reduzieren, ganz offensichtlich zu Plasmaglucagonkonzentrationen führen, die weit oberhalb des physiologischen Bereichs liegen. Die nicht sehr deutliche Dosisabhängigkeit der Plasmaglucagonkonzentrationen dürfte mit den grossen Streuungen innerhalb der einzelnen Gruppen zusammenhängen. Der verzehrsreduzierende Effekt von Glucagon scheint aufgrund der für den Effekt erforderlichen hohen

Plasmaglucaconkonzentration eher ein pharmakologischer als ein physiologischer Effekt zu sein.

Dennoch scheint endogenes Glucagon am Zustandekommen der Sättigung beteiligt zu sein, da die Injektionen von spezifischen gegen pankreatisches Glucagon gerichteten Antikörpern zu Beginn einer Mahlzeit zu einer Vergrösserung und Verlängerung der Mahlzeit führt[40]. Möglicherweise handelt es sich beim Sättigungseffekt von injiziertem Glucagon um einen sogenannten "ceiling"-Effekt. Dies würde bedeuten, dass endogenes Glucagon während einer Mahlzeit unter physiologischen Bedingungen schon maximal sättigend wirkt, und dass diese Wirkung durch Glucagonapplikation nur schwer zu steigern ist.

Ferner ist bekannt, dass Glucagon die Insulinsekretion stimuliert[71]. Da Insulin offenbar alle Stoffwechselwirkungen von Glucagon antagonisiert und selbst den Verzehr steigert[3,41], könnte die verzehrsreduzierende Wirkung von Glucagon durch eine erhöhte Insulinausschüttung nach Glucagoninjektionen gehemmt werden. Dies ist jedoch spekulativ, weil die Plasmainsulinkonzentrationen in Experiment IV nicht gemessen wurden.

Schliesslich stellt sich die Frage, ob bei Glucagoninjektionen zu Beginn einer Mahlzeit, wie in Experiment II, III und IV, überhaupt ein maximaler verzehrsreduzierender Effekt zu erwarten ist. Wie erwähnt beruhte die Verzehrssteigerung nach Injektion von MA vor allem auf einer Verkürzung des Mahlzeitenintervalls. Dies deutet darauf hin, dass die Oxidation von FS vor allem die Dauer der Sättigung nach einer Mahlzeit determiniert[39].

Da Glucagon den Verzehr möglicherweise über eine Stimulation der FS-Oxidation hemmt, sollte in zukünftigen Experimenten auch der Einfluss von Glucagon auf die Dauer von Mahlzeitenintervallen geprüft werden. In der Literatur gibt es bereits Hinweise darauf, dass Glucagon unter bestimmten Bedingungen die Mahlzeitenintervalle verlängert[3,84]. Ferner ist interessant, dass Glucagon bei Schafen,

denen während 24 Stunden zu Beginn jeder Mahlzeit nur 9 ng Glucagon pro kg Körpergewicht intrajugular injiziert wurde, die Futteraufnahme um 15.8% verringerte. Die Plasmaglucaconkonzentration war dabei nach Glucagoninjektion nur doppelt so hoch wie nach Kontrollinjektion[10].

Insgesamt sprechen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit dafür, dass der Sättigungseffekt von Glucagoninjektionen auf einer Stimulierung der Fettsäuren-Oxidation, nicht aber auf einer Stimulierung der Glycogenolyse beruht. Ferner ist der Sättigungseffekt von Glucagoninjektionen unter den von uns gewählten Versuchsbedingungen offenbar ein pharmakologischer Effekt. Die Beteiligung von endogenem Glucagon am Zustandekommen der Sättigung ist daher möglicherweise bereits unter physiologischen Bedingungen maximal.

Kapitel VI

ZUSAMMENFASSUNG

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Sättigungswirkung von Glucagon näher zu untersuchen. In den ersten Experimenten wurde geprüft, ob eine, der Injektion von Glucagon vorgeschaltete subcutane Injektion von Glucose oder Pyruvat den ausbleibenden Effekt von Glucagon auf den Verzehr bei fettreich im Gegensatz zu kohlenhydratreich gefütterten Ratten (HF- bzw. HK-Ratten) rückgängig zu machen vermag. Dabei wurde auch der Einfluss der Pyruvatinjektion auf den glycogenolytischen und hyperglycämischen Effekt von Glucagon untersucht. In weiteren Experimenten wurde der Einfluss von Mercaptoacetat, einem Inhibitor der Fettsäuren-Oxidation, auf den verzehrsreduzierenden sowie auf den glycogenolytischen und hyperglycämischen Effekt von Glucagon bei kohlenhydratreich gefütterten (HK) Ratten untersucht. Ferner interessierte der Einfluss von Ouabain, einem Inhibitor der Na^+/K^+ -ATPase, auf den Sättigungseffekt von Glucagon. Abschliessend wurden die Plasmaglucagonkonzentrationen nach Injektion unterschiedlich hoher Glucagondosen gemessen.

Die Untersuchungen ergaben folgende Resultate:

1. Nach subcutaner Glucose- oder Pyruvatinjektion, nicht jedoch nach subcutaner NaCl-Injektion (Kontrolle), reduzierte Glucagon den Verzehr bei HF-Ratten. Der glycogenolytische und hyperglycämische Effekt von Glucagon wurde durch die Pyruvatinjektion nicht beeinflusst.
2. Durch eine intraperitoneale Mercaptoacetatinjektion wurde der verzehrsreduzierende Effekt von Glucagon bei HK-Ratten vermindert. Dabei beeinflusste Mercaptoacetat den glycogenolytischen und hyperglycämischen Effekt von Glucagon nicht.

3. Durch eine intraperitoneale Ouabaininjektion wurde der verzehrs-reduzierende Effekt von Glucagon bei HK-Ratten vermindert.
4. Glucagoninjektionen, die den Verzehr reduzieren, führten zu Plasmaglucaconkonzentrationen, die um ein Vielfaches über den physiologischen Werten lagen.

Aufgrund dieser Befunde scheint die Sättigungswirkung von Glucagon auf einer Stimulation der Fettsäuren-Oxidation, nicht aber auf einer Stimulation der Glycogenolyse zu beruhen. Möglicherweise ist die Stimulation der Na^+/K^+ -ATPase und die Hyperpolarisation der Leberzellmembran durch Glucagon an dessen Sättigungseffekt ursächlich beteiligt. Ferner ist die Sättigungswirkung von exogenem Glucagon offenbar ein pharmakologischer Effekt.

Kapitel VII

SUMMARY

The present study addressed the satiety effect of pancreatic glucagon. This effect is well established with carbohydrate-rich feeding but is normally absent with fat-rich feeding. In the first experiments we tried to restore glucagon's satiety effect in rats fed a high fat diet (HF-rats) by a previous subcutaneous injection of glucose or pyruvate. The influence of the pyruvate injection on the glycogenolytic and hyperglycemic effects of glucagon was also tested. In further experiments, we investigated the effect of the fatty acid oxidation inhibitor mercaptoacetate on glucagon's glycogenolytic, hyperglycemic, and satiety effects in rats fed a high carbohydrate diet (HK-rats). The influence of ouabain, an inhibitor of the sodium-pump, on glucagon's satiety effect was also studied. Finally, plasma glucagon levels were measured after glucagon injections at various doses.

The following results were obtained:

1. A subcutaneous glucose or pyruvate injection prior to the intraperitoneal glucagon injection restored glucagon's satiety effect in HF-rats. The pyruvate injection did not affect glucagon's glycogenolytic and hyperglycemic effects.
2. An intraperitoneal mercaptoacetate injection diminished glucagon's satiety effect in HK-rats but did not affect the glycogenolytic and hyperglycemic effects of glucagon.
3. An intraperitoneal ouabain injection also diminished glucagon's satiety effect.

4. Glucagon injections which reduced feeding increased plasma glucagon levels at least 10-fold.

According to these results, the satiety effect of glucagon seems to depend on the stimulation of fatty acid oxidation by glucagon rather than on glucagon's glycogenolytic and hyperglycemic effects. A glucagon-induced stimulation of the sodium-pump and a hyperpolarisation of liver cell membranes may also be involved. However, decreased feeding after glucagon injections is apparently a pharmacological effect of the hormone, at least under the conditions tested.

LITERATURVERZEICHNIS

1. *Antin J, Gibbs J, Holt J, Young RC, Smith GP.* Cholecystokinin elicits the complete behavioral sequence of satiety in rats.
J. Comp. Physiol. Psychol. **89** (1975) 784-790
2. *Aoki TT, Smith RJ.* Glucagon and amino acid metabolism.
In: Lefèbvre PJ (ed) *Glucagon I.* Berlin: Springer (1983) 399-418
3. *Balagura S, Kanner M, Harrell LE.* Modification of feeding patterns by glucodynamic hormones.
Behav. Biol. **13** (1975) 457-465
4. *Bauché F, Sabourault D, Giudicelli Y, Nordmann J, Nordmann R.* 2-Mercaptoacetate administration depresses β -oxidation pathway through an inhibition of long chain acyl-CoA dehydrogenase activity.
Biochem. J. **196** (1981) 803-809
5. *Bauché F, Sabourault D, Giudicelli Y, Nordmann J, Nordmann R.* Inhibition in vitro of acyl-CoA-dehydrogenases by 2-mercaptoacetate in rat liver mitochondria.
Biochem. J. **215** (1983) 457-464
6. *Bellinger LL, Williams FE.* Liver denervation does not modify feeding responses to metabolic challenges or hypertonic NaCl induced water consumption.
Physiol. Behav. **30** (1983) 463-470
7. *Chiasson J-L, Cherrington AD.* Glucagon and liver glucose output in vivo.
In: Lefèbvre PJ (ed) *Glucagon I.* Berlin: Springer (1983) 361-382
8. *Claus TH, Park CR, Pilkis SJ.* Glucagon and gluconeogenesis.
In: Lefèbvre PJ (ed) *Glucagon I.* Berlin: Springer (1983) 315-360

9. *Day JL, Johansen K, Ganda OP, Soeldner JS, Gleason RE, Medgley W.* Factors governing insulin and glucagon responses during normal meals.
Clin. Endocrinol. **9** (1978) 443-454
10. *Deetz LE, Wangsness PJ.* Influence of intrajugular administration of insulin, glucagon and propionate on voluntary feed intake of sheep. *J. Anim. Sci.* **53** (1983) 427-433
11. *DeJong A, Strubbe JH, Steffens AB.* Hypothalamic influence on insulin and glucagon release in the rat.
Am. J. Physiol. **233** (1977) E380-E388
12. *Dencker M, Hedner P, Holst J, Tranberg KG.* Pancreatic glucagon response to an ordinary meal.
Scand. J. Gastroenterol. **10** (1975) 471-474
13. *Farhooody N, Gersonny A, Palmer C, Geary N.* Independence of glucagon's effects on satiety and hepatic glucose production.
Am. Psychol. Assoc. Proc. **56** (1985) 30
14. *Foster DW.* From glycogen to ketones - and back.
Diabetes **33** (1984) 1188-1199
15. *Friedmann N, Dambach G.* Antagonistic effect of insulin on glucagon-evoked hyperpolarisation. A correlation between changes in membrane potential and gluconeogenesis.
Biochim. Biophys. Acta **596** (1980) 180-185
16. *Friedmann N, Somlyo AV, Somlyo AP.* Cyclic adenosine and guanosine monophosphates and glucagon: effect on liver membrane potentials.
Science **171** (1972) 400-402
17. *Geary N, Farhooody N, Gersonny A.* Hepatic glucose production does not cause pancreatic glucagon's satiety effect.
zur Publ. eingereicht

18. *Geary N, Langhans W, Scharrer E.* Metabolic concomitants of glucagon-induced suppression of feeding in the rat.
Am. J. Physiol. **241** (1981) R330-R335
19. *Geary N, Scharrer E, Freudlsperger R, Raab W.* Adaptation to high fat diet and carbohydrate induced satiety in the rat.
Am. J. Physiol. **237** (1979) R139-R146
20. *Geary N, Smith GP.* Pancreatic glucagon and postprandial satiety in the rat.
Physiol. Behav. **28** (1982) 313-322
21. *Geary N, Smith GP.* Pancreatic glucagon fails to inhibit sham feeding in the rat.
Peptides **3** (1982) 163-166
22. *Geary N, Smith GP.* Selective hepatic vagotomy blocks pancreatic glucagon's satiety effect.
Physiol. Behav. **31** (1983) 391-394
23. *Goriya Y, Bahoric A, Marliss EB, Zinmann B, Albisser AM.* Diurnal metabolic and hormonal responses to mixed meals in healthy dogs.
Am. J. Physiol. **240** (1981) E54-E59
24. *Graf J, Petersen OH.* Cell membrane potential and resistance in liver.
J. Physiol. London **284** (1978) 105-126
25. *Helman AM, Amira R, Nicolaidis S, Assan R.* Glucagon release induced by ventrolateral hypothalamic stimulation in the rat.
Endocrinology **106** (1980) 1612-1619
26. *Holm SA.* A simple sequentially rejective multiple test procedure.
Scand. J. Statist. **6** (1979) 65-70
27. *Holst JJ.* Physiology of enteric glucagon like substances.
In: Bloom SR (ed) *Gut hormones*. Edinburgh: Churchill Livingstone (1978) 383-386

28. *Inokuchi A, Oomura Y, Nishimura H.* Effect of intracerebroventricularly infused glucagon on feeding behavior. *Physiol. Behav.* **33** (1984) 397-400
29. *Inokuchi A, Oomura Y, Shimizu N, Yamamoto T.* Central action of glucagon in rat hypothalamus. *Am. J. Physiol.* **250** (1986) R120-R126
30. *Ishida T, Chap Z, Chou J, Lewis R, Hartley C, Entman C, Field JB.* Differential effects of oral, peripheral, intravenous and intraportal glucose on hepatic uptake and insulin and glucagon extraction in conscious dogs. *J. Clin. Invest.* **72** (1983) 590-601
31. *Ishida T, Chou J, Lewis RM, Hartley CJ, Entman C, Field JB.* The effect of ingestion of meat on hepatic extraction of insulin and glucagon and hepatic glucose output in conscious dogs. *Metabolism* **32** (1983) 558-567
32. *Jaspan JB, Polonsky KS, Rubenstein AH.* The heterogeneity of immunoreactive glucagon in plasma: Clinical implications. In: Unger RH, Orci L (eds) *Glucagon: Physiology pathophysiology and morphology of the pancreatic A-cells.* New York: Elsevier (1981) 77-96
33. *Kraus-Friedmann N, Hummel L, Radomska-Pyrek A, Little JM, Leister R.* Glucagon stimulation of hepatic Na^+, K^+ -ATPase. *Molec. Cell. Biochem.* **44** (1982) 173-180
34. *Langhans W.* Glycogenolyse und Sättigung. *Diss. med. vet.* (1981) Universität München
35. *Langhans W, Egli G, Scharrer E.* Regulation of food intake by hepatic oxidative metabolism. *Brain Res. Bull.* **15** (1985) 425-428

36. *Langhans W, Geary N, Scharrer E.* Liver glycogen content decreases during meals in rats.
Am. J. Physiol. **243** (1982) R450-R453
37. *Langhans W, Pantel K, Müller-Schell W, Eggenberger E, Scharrer E.* Hepatic handling of pancreatic glucagon and glucose during meals in rats.
Am. J. Physiol. **247** (1984) R827-R832
38. *Langhans W, Scharrer E, Geary N.* Glucagon's effects on satiety and hepatic glucose production are independently affected by diet composition.
Physiol. Behav. **36** (1986) 483-487
39. *Langhans W, Scharrer E.* Role of fatty acid oxidation in control of meal pattern.
Behav. Neural. Biol. i. Druck
40. *Langhans W, Zieger U, Scharrer E, Geary N.* Stimulation of feeding in rats by intraperitoneal injection of antibodies to glucagon.
Science **218** (1982) 894-896
41. *Larue-Achagiotis C, LeMagnen J.* Effect of long-term insulin on body weight and food intake: Intravenous versus intraperitoneal routes.
Appetite **6** (1985) 319-329
42. *Lefèbvre PJ.* Glucagon and adipose tissue lipolysis.
In: Lefèbvre PJ (ed) *Glucagon I*. Berlin: Springer (1983) 419-440
43. *Luickx AS.* Immunoassays for glucagon.
In: Lefèbvre PJ, Unger RH (eds) *Glucagon molecular physiology. Clinical and therapeutic implications*. Oxford, New York: Pergamon (1982) 285-298

44. *MacIsaac L, Geary N.* Partial liver denervations dissociate the inhibitory effects of pancreatic glucagon and epinephrine on feeding.
Physiol. Behav. **35** (1985) 233-237
45. *Martin JR, Novin D.* Decreased feeding in rats following hepatic-portal infusion of glucagon.
Physiol. Behav. **19** (1977) 461-466
46. *Martin JR, Novin D, VanderWeele DA.* Loss of glucagon suppression of feeding after vagotomy in rats.
Am. J. Physiol. **234** (1978) E314-E318
47. *Mayer J.* Glucostatic mechanism of regulation of food intake.
New Engl. J. Med. **249** (1953) 13-16
48. *Mayer J.* The hypothalamic control of gastric hunger contractions as a component of the mechanism of regulation of food intake.
J. Clin. Nutrition **8** (1960) 547-561
49. *Mayer J.* Physiology of hunger and satiety: Regulation of food intake.
In: Goodhart R, Shils M (eds) *Modern nutrition in health and disease.* Philadelphia: Lea and Febiger (1973) 474-492
50. *Mayer J, Thomas DW.* Regulation of food intake and obesity.
Science **156** (1967) 328-337
51. *McGarry JD, Foster DW.* Glucagon and ketogenesis.
In: Lefèbvre PJ (ed) *Glucagon I.* Berlin: Springer (1983) 383-398
52. *McLaughlin C, Gingerich RL, Baile CA.* Decreased food intake and body weights in rats immunized against pancreatic glucagon.
Physiol. Behav. **33** (1984) 723-727
53. *Miller RE.* Pancreatic neuroendocrinology: Peripheral neural mechanisms in the regulation of the islets of Langerhans.
Endocrine Rev. **2** (1981) 471-494

54. *Muller WA, Faloona GR, Unger RH.* The influence of antecedent diet upon glucagon and insulin secretion.
New Engl. J. Med. **285** (1971) 1450-1454
55. *Naseema M, Gurd H, Gurd RS.* Identification of glucagon receptors in rat brain.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA **81** (1984) 4368-4372
56. *Niiijima A.* Glucose sensitive afferent nerve fibers in the rat liver and their role in food intake and blood glucose regulation.
J. auton. Nerv. System **9** (1983) 207-220
57. *Niiijima A.* The effect of D-glucose on the firing rate of glucose-sensitive vagal afferents in the liver in comparison with the effect of 2-deoxy-D-glucose.
J. auton. Nerv. System **10** (1984) 255-260
58. *Novin D, Robinson K, Culbreth LA, Tordoff MG.* Is there a role for the liver in the control of food intake.
Am. J. clin. Nutr. **42** (1985) 1050-1062
59. *Novin D, VanderWeele DA, Rezek M.* Infusion of 2-deoxy-D-glucose into hepatic-portal system causes eating: Evidence for peripheral glucoreceptors.
Science **181** (1973) 858-860
60. *Pantel K.* Einfluss der Nahrungszusammensetzung auf Plasmagluconkonzentration, Glycogenolyse und Sättigung.
Diss. med. vet. (1983) Universität München
61. *Patzelt C, Tager HS, Carroll RJ, Steiner DF.* Identification and processing of proglucagon in pancreatic islets.
Nature **282** (1979) 260-266
62. *Pek SB, Spangler RS.* Hormones in the control of glucagon secretion.
In: Lefèbvre PJ (ed) Glucagon II. Berlin: Springer (1983) 99-111

63. *Penick SB, Hinkle Jr LE.* Depression of food intake induced in healthy subjects by glucagon.
New Engl. J. Med. **264** (1961) 893-897
64. *Penick SB, Hinkle LE.* The effect of glucagon, phenmetracine, and epinephrine on hunger, food intake and plasma nonesterified fatty acids.
Am. J. clin. Nutr. **13** (1963) 110-114
65. *Penick SB, Smith GP.* The effects of glucagon on food intake and body weight in man.
J. Obesity **1** (1964) 1-5
66. *Petersen OH.* The effect of glucagon on the liver cell membrane potential.
J. Physiol. **239** (1974) 647-656
67. *Rodbell M.* The actions of glucagon on the adenylate cyclase system.
In: Unger RH, Orci L (eds) Glucagon: Physiology, pathophysiology and morphology of the pancreatic A-cells. New York: Elsevier (1981) 177-193
68. *Russek M.* Current status of the hepatostatic theory of food intake.
Appetite **2** (1981) 137-143, 157-162
69. *Russek M, Racotta R.* A possible role of adrenaline and glucagon in the control of food intake.
Front. Horm. Res. **6** (1980) 120-137
70. *Sachs L.* Angewandte Statistik.
Berlin: Springer (1984) 391-395
71. *Samols E, Harrison J.* Intra-islet negative insulin-glucagon feedback.
Metabolism **25** (1976) 1443-1447

72. *Scharrer E.* Der Sättigungsmechanismus.
Z. Ernährungswiss. **23** (1984) 241-254
73. *Scharrer E, Langhans W.* Control of food intake by fatty acid oxidation.
Am. J. Physiol. **250** (1986) R1003-R1006
74. *Schenk v HB, Vasquez B, Unger RH.* Lack of a "Big Plasma Glucagon" response during arginine stimulation of glucagon secretion.
Horm. Metab. Res. **14** (1982) 69-71
75. *Somlyo AP, Somlyo AV, Friedmann N.* Cyclic adenosine monophosphate, cyclic guanosine monophosphate, and glucagon: Effects on membrane potential and ion fluxes in the liver.
Ann. NY Acad. Sci. **185** (1971) 108-114
76. *Stalmans W.* Glucagon and liver glycogen metabolism.
In: Lefèbvre PJ (ed) Glucagon I. Berlin: Springer (1983) 291-314
77. *Strubbe JH, Steffens AB.* Blood glucose levels in portal and peripheral circulation and their relation to food intake in the rat.
Physiol. Behav. **19** (1977) 303-307
78. *Stunkard AJ, VanItallie TB, Reiss BB.* The mechanism of satiety: Effect of glucagon on gastric hunger contractions in man.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. **89** (1955) 258-261
79. *Sudsaneh S, Mayer J.* Regulation of metabolic events related to gastric contractions in the rat.
Am. J. Physiol. **197** (1959) 269-273
80. *Tager H, Hohenbocken M, Markese J, Dinerstein J.* Identification and localisation of glucagon-related peptides in rat brain.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA **77**(1980) 6229-6233

81. *Unger RH, Orci L.* Physiology and pathophysiology of glucagon.
Physiol. Rev. **56** (1976) 778-826
82. *Valverde J.* Heterogeneity of circulating glucagon and glucagon-like immunoreactivity.
In: Lefèbvre PJ (ed) Glucagon I. Berlin: Springer (1983) 223-244
83. *VanderWeele DA, Geiselman PJ, Novin D.* Pancreatic glucagon, food deprivation and feeding in intact and vagotomized rabbits.
Physiol. Behav. **23** (1979) 155-158
84. *VanderWeele DA, Harackiewicz E, DiConti M.* Pancreatic glucagon administration, feeding, glycemia and liver glycogen in rats.
Brain Res. Bull. **5**(1980) Suppl. 4, 17-21
85. *Weick BG, Ritter S.* Intraportal glucagon infusions: Comparison of satietogenic and glycemic effects in the rat.
Soc. Neurosci. Abstr. **10** (1984) 534
86. *Wondergem R, Harder DR.* Transmembrane potential and amino acid transport in the rat hepatocytes in primary monolayer culture.
J. Cell. Physiol. **104** (1980) 53-60

Mein besonderer Dank gilt:

Herrn Prof. Dr. E. Scharrer für die Ueberlassung des Themas und für die jederzeit gewährte freundliche Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit,

Herrn Prof. Dr. R. v. Fellenberg für die Uebernahme des Korreferates,

Herrn Dr. W. Langhans, der mit seinen Anregungen sowie seiner Mithilfe bei der Durchführung der Experimente zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat,

Herrn Dr. W. Scherrer und Herrn M. Senn für die Unterstützung bei den Experimenten,

Fräulein A. Mechsner für die Mithilfe im Labor,

Frau S. Pletscher für die Anfertigung der grafischen Darstellungen.

LEBENS LAUF

18. 3. 1959 geboren in Escholz matt LU
Vater: Robert Duss, Landwirt
Mutter: Agatha Duss, geborene Kaufmann,
Damenschneiderin
- 1966 Primarschule in Escholz matt
- 1972 Gymnasium Typ B an der
Kantonsschule in Schöpfheim
- 1976 Forts. des Gymnasiums an der
Klosterschule in Disentis GR
- 1979 Matura
- 1979 Studium der Veterinärmedizin an den
Universitäten Neuenburg und Zürich
- 1984 Staatsexamen der Veterinärmedizin
- 1984-86 Assistent am Veterinär-Physiologischen
Institut der Universität Zürich

